UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1970 N° 97

Le Cycle des Pentoses de l'Érythrocyte

en présence de bleu de méthylène

THÈSE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement en Juin 1970

par

Dominique GOURDIN

Membres du Jury

MM. J. RUFFIÉ *Président*

L. DOUSTE-BLAZY
R. AGID
H. VERGNES
Assesseurs

J. DUCOS *Suppléant*

Centre d'Hémotypologie du Centre National de la Recherche Scientifique - R. C. P. 87
Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie
TOULOUSE

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536511_0055

Le Cycle des Pentoses de l'Érythrocyte

en présence de bleu de méthylène

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1970 — Nº 97

Le Cycle des Pentoses de l'Érythrocyte

en présence de bleu de méthylène

THÈSE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement en Juin 1970

par

Dominique GOURDIN

Membres du Jury

MM. J. RUFFIÉ *Président*

L. DOUSTE-BLAZY
R. AGID
H. VERGNES
Assesseurs

J. DUCOS *Suppléant*

Centre d'Hémotypologie du Centre National de la Recherche Scientifique - R. C. P. 87
Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie
TOULOUSE

—

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

en témoignage de ma reconnaissance infinie

A TOUTE MA FAMILLE

A LA MÉMOIRE DE MA SOEUR

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur Jacques RUFFIE

Nous exprimons notre vive admiration devant l'étendue de vos connaissances et nous ressentons le grand honneur que vous nous avez fait en nous acceptant dans votre équipe.

Votre intérêt attentif a toujours été pour nous, au cours de ce travail le soutien le plus constant.

Il m'est d'autant plus difficile de vous présenter cette étude qu'elle n'aurait pas mérité d'imperfections.

Je vous demande de la considérer comme le témoignage de ma profonde gratitude.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur Louis DOUSTE-BLAZY

Pour qui nous avons une gratitude particulière pour l'enseignement si clair et si précis qu'il nous a prodigué au cours de nos premières années d'études.
Que ce travail soit le gage de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur René AGID

J'ai eu le privilège de recevoir votre enseignement à la faculté des Sciences.
Soyez assuré de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Jean DUCOS

Que ce travail soit pour nous l'occasion d'exprimer la grande admiration que nous avons pour vous.
Soyez assuré de notre profond respect et de notre fidèle attachement.

Monsieur le Docteur Henri VERGNES

Vous nous avez toujours réservé l'accueil le plus bienveillant et je vous dois ma formation au laboratoire d'Enzymologie.
Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigué durant l'élaboration de ce travail.

N ous tenons particulièrement à remercier Madame le Docteur F. SHAPIRA et Monsieur le Professeur J.C. KAPLAN de l'Institut de Pathologie Moléculaire de Paris, pour leurs précieux renseignements qu'ils nous ont aimablement communiqué.

Monsieur le Docteur R. BIERMÉ, Monsieur le Docteur De BOISSEZON, Messieurs les Docteurs C. BOULOUX, J. CONSTANS, A. MONNET ainsi que Mademoiselle le Docteur A. SENDRAIL, Monsieur A. CLERC et Mademoiselle M. GÉRARDY pour leurs conseils judicieux.

Au personnel du Centre de Transfusion Sanguine

Aux laborantines du Laboratoire d'Enzymologie et particulièrement à Mesdames C. PERRETI, J. HILLAT, D. FORTET ainsi que Mesdemoiselles G. CARTIÉRY, L. STAGNI et R.C. HAARFI et à toutes les laborantines dont le dévouement sans défaillance a permis de mener à bien ce travail.

Au personnel du Secrétariat :
- Madame R. JOUCLA
- Madame L. BRUNIERA
- Mademoiselle M. RIVIERE
- Mademoiselle N. MARTINAUD

auquel nous exprimons nos sincères remerciements.

UNIVERSITE

DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DE PERSONNEL

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Doyen : Monsieur LAZORTHES

Assesseur (Médecine) : Monsieur MONNIER

Assesseur (Pharmacie) : Monsieur BREUILLAUD

Doyens honoraires : MM. GORSE, CALVET, BRUSTIER
MM. VALLOIS, TAPIE, DELAS
RISER, BUGNARD, VINCENT
MOREL, BOUISSET,
CALMETTES, THOMAS,
LAGROT, DULUCQ.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

SECTION MEDECINE

- Clinique médicale et cardiologique	MM. MERIEL
- Clinique médicale sud	GADRAT
- Clinique chirurgicale	FICAT
- Clinique Chirurgicale et Gynécologique	FABRE Pierre
- Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
- Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	PASQUIE
- Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	RIEUNAU
- Clinique de chirurgie cardio-vasculaire	ENJALBERT
- Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
- Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
- Clinique des maladies infectieuses	N...

.../...

- Clinique médicale infantile et puériculture		SOREL
- Clinique médicale de la première enfance		BARDIER
- Clinique de neuro-chirurgie		LAZORTHES
- Clinique neurologique et psychiatrique		GERAUD
- Clinique Obstétricale		PONTONNIER
- Clinique odonto-stomatologique		CADENAT
- Clinique ophtalmologique		N...
- Clinique O R L et chirurgie maxillo faciale		CALVET
- Clinique de pneumo-phtisiologie		DELAUBE
- Clinique rhumatologique		RUFFIE René
- Accouchement et obstétrique sociale		JAHIER
- Anatomie		BASTIDE
- Anatomie appliquée		POULHES
- Anatomie pathologique		FABRE Jacques
- Anesthésie et réanimation		LARENG
- Bactériologie et virologie	Mme	ENJALBERT
- Biophysique médicale A		AUVERGNAT
- Biophysique médicale B		BRU
- Chimie biologique		VALDIGUIE Paul
- Electro-radiologie		MARQUES
- Embryologie générale	MM.	BROUSSY Jean
- Hématologie		RUFFIE Jacques
- Histologie		BIMES
- Hydrologie thérapeutique et climatologie		DARNAUD
- Hygiène et Médecine sociale		MONNIER
- Immunologie		DUCOS
- Médecine légale et médecine du travail		PLANQUES
- Pathologie chirurgicale		DAMBRIN
- Pathologie générale et médecine expérimentale		SENDRAIL
- Pathologie médicale		RIBAUT
- Physiologie		LAPORTE Yves
- Physiologie appliquée et pharmacologie		BAISSET

.../...

- Sémiologie et clinique médicale		LAPORTE Jacques
- Thérapeutique		DARDENNE

- PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL -

- Histologie et embryologie	MM.	GUILHEM
- Anatomie pathologique		BOUISSOU
- Biochimie médicale		DOUSTE-BLAZY
- Histologie et embryologie		PLANEL
- Maladies infectieuses		ARMENGAUD
- Oto-Rhino-Laryngologie		CLAUX
- Pathologie médicale		BOULARD
- Physiologie		MONTASTRUC
- Physiologie		BESSOU
- Physique médicale		COMMANAY
- Pneumo-Phtisiologie		MIGUERES

- PROFESSEURS SANS CHAIRE -

- Anatomie pathologique	MM.	FABRE Jean
- Bactériologie, parasitologie, virologie	Mme	LARENQ
- Biochimie médicale		VALDIGUIE Pierre
- Chirurgie générale		GEDEON
- Chirurgie générale		SARRAZIN
- Chirurgie thoracique et cardio vasculaire		ESCHAPASSE
- Electro-radiologie		PONS
- Electro-radiologie		ROULLEAU
- Médecine générale et thérapeutique		BOLLINELLI
- Ophtalmologie		DEODATI
- Pédiatrie		DALOUS
- Neuro-Chirurgie		ESPAGNO Jacques
- Médecine générale et thérapeutique		[illegible]
- Pédiatrie		REGNIER
- Médecine générale		RIBET

.../...

- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES -

- Carcinologie	MM. ESTRADE
- Médecine générale et thérapeutique	BES
- Pathologie expérimentale	GLEIZES
- Médecine générale	ARLET Jacques
- Thérapeutique, réanimation médicale, rééducation fonctionnelle et hydrologie	SALVADOR J.Michel
- Radiologie	COMBES P.François
- Pneumo-phtisiologie	ALBAREDE J.Louis
- Pédiatrie génétique médicale	ROCHICCIOLI
- Chirugie générale	ESCAT Jean
	COSTALIOLA DI POLIDOVI
- Orthopédie traumatologie, chirurgie plastique et reconstructive	UTHESA
- Urologie	PONTONNIER Francis
- Histologie embryologie cytogénétique	SOLEILHAVOUP
- Biophysique	GUIRAUD Robert
- Physiologie	PAGES Bernard
- Parasitologie	LARROUY
- Immunologie hématologie, maladies du sang (option biologique)	BIERME Robert
- Anatomie et organogénèse (option clinique)	JUSKIEWENSKI

- A.G.R.E.G.E.S -

- Médecine générale	MM. CALAZEL
- Médecine générale	RASCOL
- Médecine générale	LE TALLEC
- Chirurgie générale	GAUBERT
- Dermato et syphiligraphie	DUPRE
- Hydrologie	DENARD
- Médecine légale	GREZES-RUEFF
- Neurologie et psychiatrie	GAYRAL
- Obstétrique	ESPAGNO Guy

.../...

- Ophtalmologie BEC

- AGREGES LIBRES -

- Chirurgie générale MM. SOUQUET
- Pathologie chirurgicale DIEULAFE

- MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE -

- Psychiatrie LABOUCARIE

SECTION PHARMACIE

- Botanique et cryptogamie N...
- Chimie et analytique PITET
- Toxicologie, Hygiène industrielle et Hydrologie BOURBON
- Chimie pharmaceutique BLANC
- Microbiologie BREUILLAUD
- Pharmacie chimique et pharmacodynamie CAUJOLLE
- Pharmacie galénique et matière médicale STANISLAS
- Physiologie, zoologie et parasitologie pharmaceutique ROUX

- PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL -

- Pharmacie MM. COUTURIER
- Sciences naturelles Mme CAUJOLLE
- Toxicologie M. BROUSSY Georges

- PROFESSEURS SANS CHAIRE -

- Chimie organique M. BERTRAND
- Zoologie GAYREL

.../...

- MAITRES DE CONFERENCES AGREGÈS

- Botanique	Mme	LASCOMBES
- Microbiologie	MM.	Michel Georges
- Pharmacodynamie		CROS Jean
- Physiologie		DUMAS J.Claude
- Pharmacie galénique		ROUFFIAC Robert
- Chimie biologique		SOULA Georges
- Toxicologie		MALBOSC Robert

- PERSONNEL ADMINISTRATIF -

Secrétaire Principal : Monsieur J. ROCHE

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (délibération en date du 12 Mai 1891).

PREFACE

Depuis la découverte par CARSON, *en 1956, du déficit en G-6-PD érythrocytaire chez l'homme, les progrès dans la connaissance* des processus mutationnels affectant certains systèmes enzymatiques des éléments figurés du sang *ont été très rapides.*

Entre cette date et 1968, plus de douze anomalies métaboliques à incidence hémolytique impliquant différents biocatalyseurs du globule rouge humain, ont été identifiées et étudiées sous le triple aspect de la biochimie, de la génétique et de la pathologie hématologique.

L'ensemble des données obtenues à la suite des nombreuses recherches effectuées par des équipes pluridisciplinaires groupant hématologistes, biochimistes et généticiens ont défini un nouveau chapitre de la Pathologie Moléculaire : celui des Enzymopathies. Dans le même temps, se précisait une notion très particulière : celle du polymorphisme des grands systèmes enzymatiques sanguins par la découverte des isoenzymes érythrocytaires et de leurs variations. Ainsi s'ouvrait une voie de recherche complémentaire en quelque sorte, de la précédente, celle des variantes moléculaires des enzymes chez l'homme.

Elle permettait de définir des phénotypes enzymatiques, d'entreprendre l'étude de la répartition de ces enzymotypes dans les populations mondiales, et conjuguée aux études métaboliques, d'entrevoir à travers la diversification des enzymes dans les races humaines un moyen d'approche sur le plan moléculaire de la relation gène-milieu et de mieux comprendre la valeur sélective et adaptative de certaines mutations.

On ne doit pas oublier que l'ensemble de ces grands travaux, sous le double aspect quantitatif et qualitatif, ont été menés à bien sur l'un des éléments essentiels du sang : l'érythrocyte. Cette cellule singulière, trait d'union indispensable sur le plan physiologique entre le milieu ambiant et les tissus dans les organismes des vertébrés, doit-être considérée comme l'un des exemples les plus remarquables de spécialisation évolutive au cours de la phylogénèse.

En effet, l'hyperadaptation de cet élément s'accentue progressivement depuis les vertébrés inférieurs, au cours du passage des formes aquatiques aux formes aériennes jusqu'aux vertébrés supérieurs et aux mammifères.

Chez ces derniers, l'hématie du sang circulant acquiert le maximum de différenciation, de spécialisation, subissant de ce fait de profonds remaniements anatomiques (perte du noyau, des mitochondries, des ribosomes) et biochimiques (absence de synthèse protéique nouvelle dans la cellule adulte par suite de la disparition du matériel nucléaire).

A ce palier évolutif, l'érythrocyte chargé à 95 % de sa masse du pigment respiratoire, l'hémoglobine, voit son rôle physiologique étroitement circonscrit dans l'organisme aux échanges gazeux entre tissus et milieu extérieur. Le métabolisme de cet élément subit le contre coup de cette adaptation extrême ; il est orienté vers la protection de l'hémoglobine et le maintien de ses propriétés physiologiques pendant la vie de la cellule.

Le travail de Dominique GOURDIN que nous présentons ici, a pour objet l'étude de l'une des chaînes biochimiques à laquelle est dévolue un rôle fondamental dans le métabolisme érythrocytaire : la voie des Pentoses Phosphates. Depuis sa découverte par B.L. HORECKER, le cycle des pentoses, séquence métabolique universelle, par sa signification physiologique dans le globule rouge, a donné lieu à de nombreux travaux. On en était arrivé à des conclusions solides concernant son rôle primaire, que nous pouvons brièvement énumérer ici : production de $NADPH_2$ et participation à l'équilibre oxydo-réducteur de l'hématie, faible production d'énergie (inférieure à 10 % d'après les résultats de BRIN et YONEMOTO) ; synthèse non oxydative de métabolites intermédiaires d'importance essentielle : Ribose-5-Phosphate et Tétroses phosphates. Si les grandes étapes séquentielles de la voie des pentoses érythrocytaires étaient depuis quelques années bien cadrées et analysées sur le plan enzymatique, les potentialités oxydatives de ce cycle demeuraient mal connues. Les recherches récemment poursuivies par M.D. SASS et ses collaborateurs sur la stimulation in vitro de cette voie par des produits chimiques accepteurs d'Hydrogène, dont le plus utilisé est le Bleu de Méthylène, permettait de franchir un pas important dans la connaissance des mécanismes biochimiques complexes intéressant les enzymes de ce shunt métabolique.

Les travaux des chercheurs américains mettaient en lumière le phénomène de pénétration active du bleu de méthylène à travers la membrane globulaire, et sa réduction en leucodérivé à l'intérieur de la cellule. Les capacités d'accumulation et de réduction du bleu par l'hématie, sont directement liées à la formation accrue de $NADPH_2$ par stimulation oxydative des premières séquences du cycle des pentoses. Ici interviennent bien sûr les NADP oxydo-réductases et essentiellement la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD), enzyme clé de cette voie, dont l'incidence génétique et anthropologique de ses mutations a été largement discutée au cours de ces dernières années.

Mais la complexité des mécanismes consécutifs à ce processus de fixation intra-cellulaire de grosses quantités de colorant apparaissait alors et SASS avait pourtant donné une première vue synthétique de ce phénomène faisant intervenir paradoxalement en présence d'oxygène une chaîne d'oxydo-réduction, couplant $NADPH_2$, méthémoglobine réductase-NADP dépendante et bleu de méthylène.

Le résultat est un état particulier de l'hématie dont les capacités réductrices sont en quelque sorte décuplées et représente le «reductive trapping» de SASS.

Une exploration plus poussée de l'incidence de ce «reductive trapping» sur le métabolisme de l'hématie normale et pathologique s'avérait indispensable.

C'est le grand mérite de Dominique GOURDIN d'avoir entrepris et mené à bien un tel travail. Avec une remarquable précision, faisant preuve d'une profonde rigueur scientifique, il a méthodiquement analysé point par point le shunt d'HORECKER soumis à l'action du bleu de méthylène dans le globule rouge normal et au cours d'affections hématologiques : congénitales (anémies hémolytiques par déficit enzymatique) ou acquises. Je crois que l'on peut dégager de cet ouvrage quatre éléments originaux :

1) Une technique d'étude globale des séquences enzymatiques du cycle des pentoses, basée sur la capacité de réduction du bleu de méthylène par le globule rouge, réalisée en cinétique continue au spectrophotomètre à 660 mμ. Ce protocole expérimental s'est révélé d'une grande sensiblité et d'application pratique assez aisée.

2) Une analyse complète des phénomènes métaboliques déclenchés dans l'hématie à la suite de ce «reductive trapping». Il s'agit là d'une longue investigation biochimique conduite avec une grande maitrise et abordant tour à tour les effets du colorant sur les systèmes enzymatiques du globule rouge, le retentissement sur la charge hémoglobinique, le devenir du leuco-dérivé et surtout l'interaction possible entre ce composé et l'ambiance extérieure du globule rouge.

3) Une application pratique de cette recherche en Pathologie Sanguine et en Génétique Moléculaire dont on comprendra tout l'intérêt.

4) Enfin, dans un dernier chapitre, est abordé le problème anthropo-biologique. On connaît toute l'importance en Génétique Humaine des caractères «marqueurs» et parmi eux de la G6PD erythrocytaire. Elément essentiel du stock génique humain, dont le locus est parfaitement localisé sur le chromosome X, ce facteur est considéré à juste titre comme le «pace maker» de cette voie métabolique, d'où l'intérêt de son étude dans les populations. L'auteur, après un rappel très complet sur la répartition mondiale des mutations de cette enzyme, a axé son travail sur le favisme. Il a fait une synthèse très utile des nombreux aspects biochimiques et génétiques que pose cette affection propre aux méditerranéens.

Oeuvre d'expérimentation et de synthèse, le travail de Dominique GOURDIN, ouvre de vastes perspectives sur le plan de la Biologie Moléculaire.

Certaines des conclusions sur lesquelles il débouche, apporteront des renseignements précieux et des clartés nouvelles à tous ceux qui se penchent sur les problèmes hématologiques, biochimiques et génétiques que soulèvent la physiologie et la physiopathologie du globule rouge humain.

Docteur Henri VERGNES,

Chef du Département de Biologie Moléculaire.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIOCHIMIQUE DE L'ERYTHROCYTE HUMAIN

Durant les quinze dernières années, notre compréhension du métabolisme du globule rouge a fait d'importants progrès. Ces études ont fourni une base pour décrire, en termes biochimiques, bien des changements qui sont associés à la maturation de l'érythrocyte.

De plus, l'essor pris par l'enzymologie érythrocytaire, a permis d'identifier jusqu'ici les déficits d'une quinzaine de variétés d'enzymes (fig. 1), pour la plupart congénitaux (glucose-6-phosphate-déshydrogénase, 6-phospho-gluconate-déshydrogénase, hexokinase, triose phosphate isomérase, diphosphoglycérate mutase, pyruvate kinase, ATPase glutathion réductase, glutathion synthétase, DPNH et TPNH méthémoglobine réductase, cholinestérase, catalase, galactose-1-phosphate-uridyl-transferase, galacto kinase).

Certains de ces déficits n'ont aucune traduction clinique et intéressent plus le généticien que l'hématologiste. D'autres ne sont que le témoignage de la diffusion d'un déficit enzymatique, important pour certains métabolismes viscéraux, mais non pour l'hématie.

La fonction primordiale du globule rouge mûr, en circulation, est le transport de l'oxygène des poumons aux tissus et du gaz carbonique des tissus aux poumons. Celui-ci est assuré par l'hémoglobine qui représente 95 % des protéines globulaires. Le métabolisme de l'érythrocyte peut alors s'envisager selon deux orientations :

- Energétique
- Réductrice

chacune maintenant l'intégrité des structures permettant le transport des gaz.

Nous envisagerons donc la première en abordant l'étude de la voie des trioses.

Enzymopénie	Premier cas rapporté en :	Nombre de cas connus	Hémolyse
Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase	1956	10^{8}_{-}	$\pm$
6-Phospho-Gluconate Déshydrogénase	1964	20	-
Glutathion-Réductase	1962	63	+
Glutathion-Péroxydase	1967	4	+
Glutathion-Synthétase	1961	8	+
$NADH_2$ Méthémoglobine Réductase	1948	250	-
$NADPH_2$ Méthémoglobine Réductase	1967	1	-
Hexo-Kinase	1967	6	+
Phospho-Glucose-Isomérase	1967	9	+
Triose-Phosphate-Isomérase	1965	7	+
2-3-Diphospho-Glycéromutase	1959	12	+
Pyruvate Kinase	1961	100	+
Adénosine Triphosphatase	1964	3	+
Haut niveau d'ATP	1964	27	-
Catalase	1947	92	-

FIGURE 1 : Tableau des différentes enzymopénies héréditaires décrites au niveau de l'érythrocyte humain. (D'après GRIMES (149); modifié).

CHAPITRE PREMIER

LA VOIE DES TRIOSES

1 – MODIFICATIONS METABOLIQUES ASSOCIEES A LA MATURATION DU GLOBULE ROUGE –

Le globule rouge circulant provient de cellules de la moëlle osseuse, qui morphologiquement, à partir d'une cellule souche multipotentielle, se transforment en types cellulaires qui se différencient de façon croissante, par maturation et différenciation simultanées.

La capacité de la cellule à synthétiser de l'ADN et probablement de se diviser, est perdue au stade de maturation du normoblaste polychromatophile et progressivement on assiste à une simplification qui limite l'érythrocyte à un catabolisme glucidique quasi exclusif (29).

La figure 2 résume les modifications biochimiques associées à la maturation et au vieillissement de l'érythrocyte. Au total, nous retiendrons l'hétérogénéité métabolique de l'érythrocyte circulant tant qualitative que quantitative au fur et à mesure que cette cellule vieillit.

2 – METABOLISME GLUCIDIQUE DU GLOBULE ROUGE MUR –

1) MISE EN PLACE DES DIFFERENTES SEQUENCES

La source principale d'énergie dérive de la dégradation du glucose. Il est d'abord phosphorylé en glucose-6-phosphate grâce à une hexokinase en présence d'ATP.

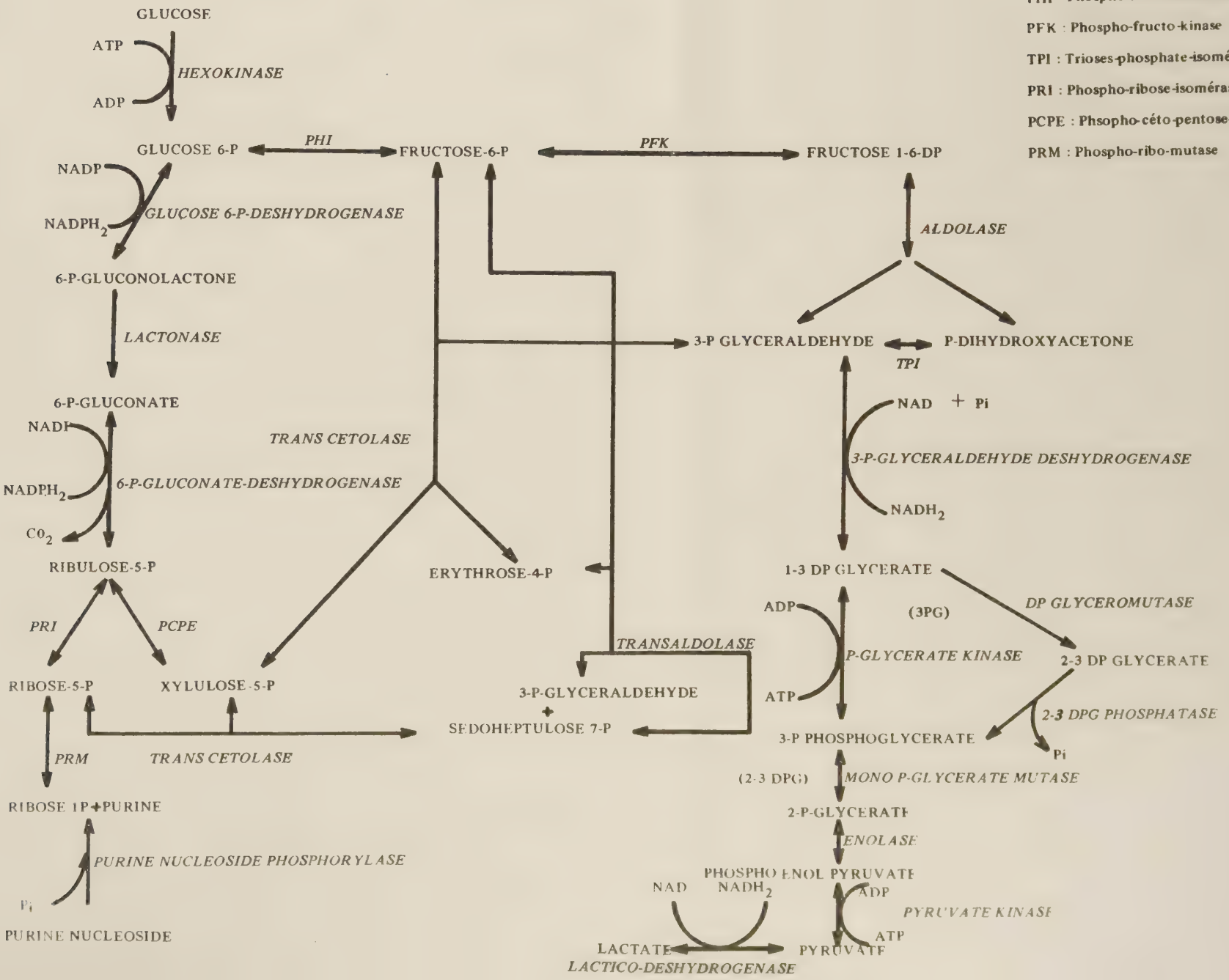
Le glucose-6-phosphate formé, peut suivre un double devenir, soit être dégradé en pyruvate par la voie des trioses selon le schéma classique d'EMBDEN MEYERHOF, soit emprunter la voie des pentoses phosphates décrite par DICKENS et HORECKER.

Cette deuxième voie métabolique est placée en dérivation de la voie principale qu'elle rejoint en deux endroits, au niveau du fructose-6-phosphate et au niveau du 3-phosphoglycéraldéhyde (fig. 3).

	Normoblastes jeunes	Normoblastes âgés	Réticulo-cytes	Jeunes érythro-cytes	Erythrocy-âgés
Synthèse de l'ADN	+	0	0	0	0
Synthèse de l'ARN	+	+	+	0	0
Synthèse des protéines	+	+	+	0	0
Synthèse de l'hème	+	+	+	0	0
Synthèse des lipides	+	+	+	+ -	0
Glycolyse anaérobie	+	+	+	+	+ -
La voie des pentoses	+	+	+	+	+ -
Cycle tricarboxylique	+	+	+	0	0
Système des cytochromes	+	+	+	0	0

FIGURE 2 : Etat métabolique de l'érythrocyte en fonction de l'âge.

FIGURE 3 METABOLISME GLUCIDIQUE DU GLOBULE ROUGE



ABREVIATIONS

PHI : Phosphohexose-isomérase
PFK : Phospho-fructo-kinase
TPI : Trioses-phosphate-isomérase
PRI : Phospho-ribose-isomérase
PCPE : Phsopho-céto-pentose-épimé
PRM : Phospho-ribo-mutase

Le pourcentage de glucose métabolisé par chacune de ces deux voies est avant tout fonction de l'environnement de la cellule, au premier chef duquel nous trouvons les substances oxydantes.

A l'état normal, 90 % du glucose est métabolisé selon la voie des trioses et 10 % par la voie des pentoses.

L'ATP est synthétisé par la voie des trioses au niveau de deux réactions impliquant la phosphoglycérate-kinase et la pyruvate-kinase.

Lorsqu'on dose les différents métabolites intermédiaires (39), on est frappé par le niveau relativement élevé de glucose 1-6 diphosphate et de 2-3 diphosphoglycérate (2-3DPG). Ce dernier métabolite nous retiendra, car il est impliqué dans un by-pass métabolique particulier à quelques érythrocytes de mammifères : le cycle de RAPPOPORT et LUEBERING (144) et son rôle commence à être entrevu.

Ce cycle dérive l'acide 1-3 diphosphoglycérique – composé riche en énergie – vers le 2-3 diphosphoglycérate présent en grande quantité dans l'érythrocyte humain. Cette réaction s'opère sous l'influence d'une 1-3 diphosphoglycéromutase. Le 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG) peut à son tour rejoindre la voie des trioses au niveau de l'Acide 3-phosphoglycérique après action d'une 2-3-diphosphoglycérate-phosphatase. Ces deux réactions sont irréversibles et elles évitent la libération d'ATP qui se produit au niveau de la voie des trioses sous l'influence de la phosphoglycérate-kinase.

Pendant longtemps, on a fait jouer à ce cycle, un simple rôle de régulateur de la libération d'ATP et lorsqu'une molécule de glucose est dégradée en suivant, ce by-pass, le bilan de la glycolyse devient nul. De plus, depuis les travaux, notamment de BENESH et de CHANUTIN (60, 141), on connaît le rôle capital que peut jouer le 2-3 DPG, comme modulateur de l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine avec laquelle il se lie de telle sorte que l'équation de dissociation devrait s'écrire en fait :

$$(Hb - 2\text{-}3\ DPG) + 0_2 \rightleftharpoons Hb0_2 + 2\text{-}3\ DPG$$

Le 2-3 DPG ne se fixe que sur l'hémoglobine qui est sous forme de tétramère en conformation desoxy. La conséquence de cette fixation est une translation vers la droite de la courbe de saturation de l'hémoglobine en fonction de la $p0_2$. Elle aboutit pour une même $p0_2$, à la libération d'une quantité plus grande d'0_2 à partir de l'oxyhémoglobine, au niveau des tissus.

Le cycle de RAPPOPORT n'est pas présent dans toutes les hématies de mammifères. Dans les hématies de tortues, ce triose diphosphate est remplacé par de l'inositol hexaphosphate qui semble avoir le même rôle. Au total, l'érythrocyte humain élabore de l'ATP sans demande d'oxygène ni participation des cytochromes, en ce qui concerne l'immense majorité de la population cellulaire circulante.

L'érythrocyte utilise une grande part de cet ATP pour le transfert actif des cations : expulsion du Na^+ et maintien du K^+. Ce dérivé est constamment dégradé par une enzyme : l'ATPase et la réaction est activée par le Mg^{++}, le Na^+ et le K^+. La libération d'énergie sera utilisée pour les transferts ioniques transmembranaires et peut être aussi dans le maintien de la forme biconcave de l'érythrocyte.

Nous venons de brosser de manière succinte, les éléments impliqués dans la libération d'énergie au niveau de l'érythrocyte humain et son utilisation membranaire dans le transport actif des cations.

Nous observerons, plus loin, les phénomènes rédox qui doivent-être envisagés de manière globale. Nous devons remarquer que le globule rouge offre, jusqu'à ce jour, un exemple singulier de la coexistence, apparemment sans relation, d'une production d'énergie sans participation d'oxygène au niveau d'une chaîne respiratoire d'une part, et d'autre part d'une chaîne de transport fonctionnant à des fins uniquement réductrices.

2) REGULATION DE LA VOIE DES TRIOSES

Une propriété inhérente à toute cellule métaboliquement compétente, est l'autorégulation de la production et de la consommation d'énergie.

L'érythrocyte mûr a un métabolisme très simplifié, et il est très souvent cité comme exemple d'autorégulation métabolique. Nous verrons que le métabolisme a non seulement pour but la libération d'énergie nécessaire au maintien des structures, mais qu'il intervient aussi en modulateur de la fonction de transport de l'0_2 par l'hémoglobine.

Cette régulation fait appel à deux notions de physico-chimie :

– la notion d'enzyme à cinétique lente, représentant un goulet d'étranglement (rate limiting enzyme) au premier rang desquels se trouve l'hexokinase,

– les phénomènes d'inhibition allostérique.

Il est possible de juger de l'activité globale de la voie des trioses en dosant l'acide lactique formé, à un instant donné, au niveau d'érythrocytes mis à incuber en présence de glucose. Les constatations des premiers auteurs (37) montrèrent que le pH optimum de cette activité globale est de 8 : valeur sensiblement différente du pH physiologique, mais voisine du pH optimum d'activité de l'hexokinase.

De plus, l'hémolysat est capable de produire du lactate à condition d'ajouter au milieu par ordre d'importance décroissante, du DPN, de l'ATP et l'ion magnésium et phosphate.

Par la suite, quelques notions se précisèrent. D'après les travaux de MINAKAMI et YOSHIKAWA (127), basés sur des conditions théoriques, il ressort que trois enzymes possèdent une vitesse de réaction telle, qu'elle limite la glycolyse : l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase.

L'hexokinase et surtout la phosphofructokinase, sont très affectées par une baisse de pH. Pour un pH voisin de 7,0 la voie des trioses est totalement inopérante (22).

De plus, l'hexokinase est inhibée par le produit de sa réaction : le glucose-6-phosphate, et la phosphofructokinase voit diminuer son activité en présence d'ATP. Mais ces deux inhibitions peuvent être levées, si le taux de phosphore inorganique intra-cellulaire s'élève et au total dans des conditions où une activité métabolique supplémentaire, est nécessaire (128, 129) – (Fig. 3).

Enfin le troisième enzyme : la pyruvate-kinase, n'est probablement pas une étape qui ralentit la glycolyse, car à l'état naturel, elle n'est pas saturée par son substrat : le phospho-énol-pyruvate (130, 131). Remarquons que la pyruvate-kinase érythrocytaire, à l'inverse du même enzyme leucocytaire, possède une Km fortement influencée par la concentration d'ADP (145) ; enfin, cette enzyme est activée par le fructose 1-6 diphosphate, et elle est inhibée par l'ATP.

Au total, retenons que la voie des trioses présente deux étapes qui limitent la vitesse de production du lactate, aux niveaux de la phosphofructokinase et de l'héxokinase. Cette dernière enzyme semble avoir un rôle primordial que nous allons continuer à envisager en étudiant quelques faits concernant la régulation du cycle de RAPPOPORT et LUEBERING. Nous avons déjà mentionné que ce shunt dérivait le 1-3 diphosphoglycérate vers le 3-phosphoglycérate, avec formation d'un intermédiaire présent en quantité considérable le 2-3 diphosphoglycérate selon deux réactions enzymatiques irréversibles. Nous ajouterons de plus, que le 3-phosphoglycérate est le cofacteur intermédiaire dans la réaction catalysée par la 1-3-diphosphoglycéromutase, et que le 2-3 diphosphoglycérate peut jouer le même rôle dans la réaction catalysée par la 3-phosphoglycéromutase.

Mais le 2-3-diphosphoglycérate représente le métabolite -clé, modulateur de la saturation en 0_2 de l'hémoglobine et ce mécanisme est étroitement connecté avec l'activité de la voie des trioses.

Les travaux de BREWER (142) nous ont appris que le 2-3 diphosphoglycérate inhibait l'activité de l'héxokinase ; mais cette inhibition peut être levée par l'ATP et l'ion Mg^{++} à des concentrations situées dans l'intervalle physiologique.

Nous noterons en outre que la diphospho-glycéro-mutase est inhibée par le produit de sa réaction : le 2-3 diphosphoglycérate (60).

Ces deux constatations nous permettent d'envisager un mécanisme de feed-back, entre la voie des trioses d'une part, et le taux d'oxyhémoglobine d'autre part, (Fig. 4).

Lorsque la pression partielle en oxygène vient à diminuer, le taux d'hémoglobine réduite augmente ; celle-ci va fixer une quantité supplémentaire de 2-3 DPG. La diminution de la quantité de ce triose diphosphate libre aboutit à une levée du frein qu'il exerçait aux niveaux de l'héxokinase d'une part, et de la diphosphoglycéromutase d'autre part.

Ainsi, la voie des trioses subit une stimulation relative qui élèvera le niveau de 2-3 DPG. Réciproquement, le retour à un environnement où la pression partielle en 0_2 est redevenue normale aboutit : dans un premier temps à la libération du 2-3 DPG combiné à l'hémoglobine réduite, car l'oxygène est compétitif (Fig. 3). Par la suite, le 2-3 DPG libre exerce un freinage aux niveaux de la diphosphoglycéromutase et de l'hexokinase, c'est à dire ralentit sa propre synthèse.

De tels faits ont pu être observés in vitro (60) : on ne constate aucune modification de l'activité de la voie des trioses et du niveau de 2-3 DPG en présence d'0_2 ou d'oxyde de carbone.

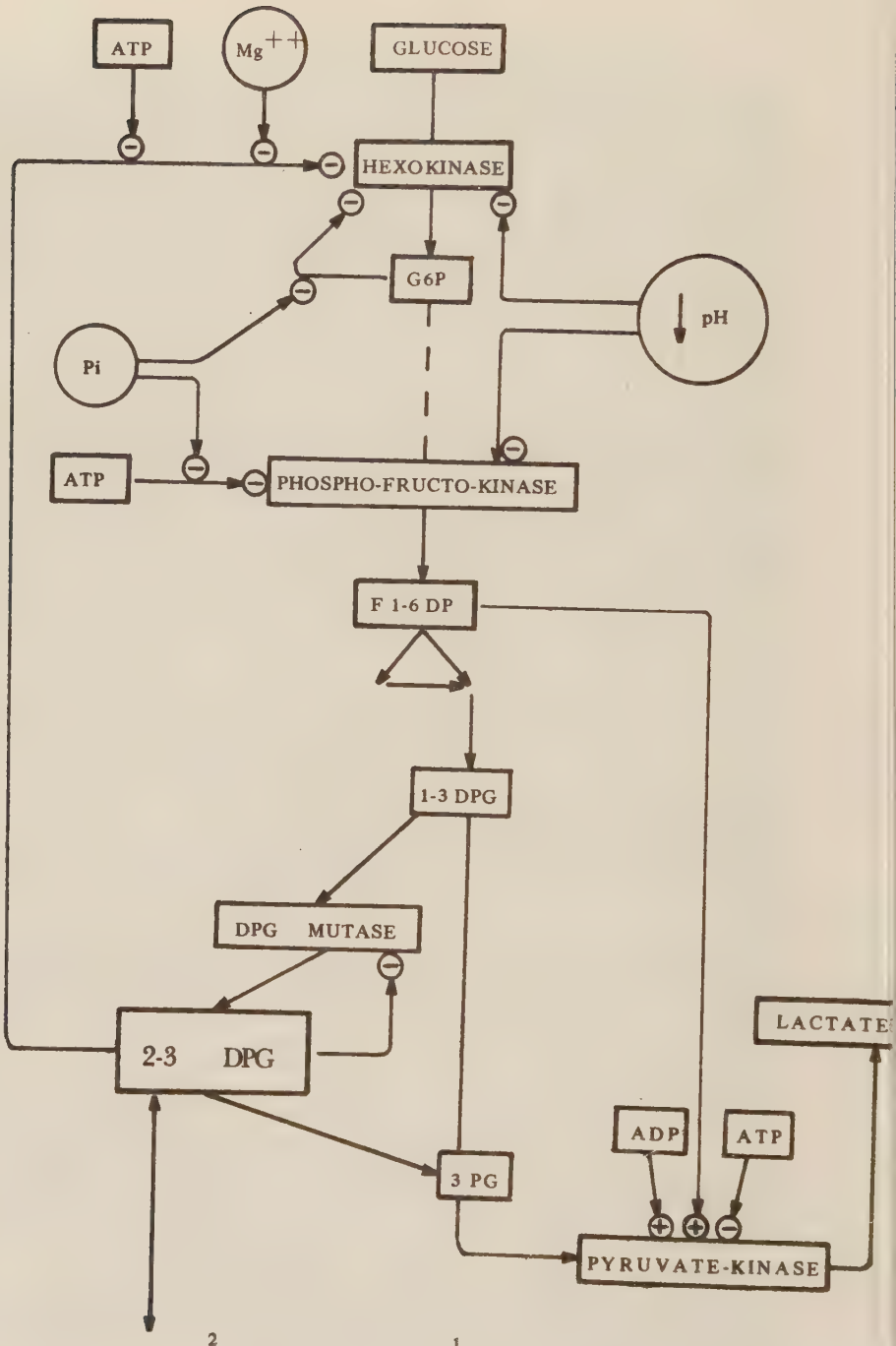


FIGURE 4 – SCHÉMA DE LA RÉGULATION ALLOSTÉRIQUE DE LA VOIE DES TRIOSES

Par contre, on note une stimulation très nette, sous atmosphère d'azote. Ces mécanismes ont été vérifiés chez l'homme dans de nombreuses circonstances physiologiques et pathologiques, et nous mentionnerons principalement l'adaptation à l'altitude. Les populations vivant en altitude (3 000 à 4 000 mètres) présentent un haut niveau de 2-3 DPG érythrocytaire avec translation à droite de la courbe de saturation de l'hémoglobine. Ces modifications sont réversibles et s'estompent en quelques semaines, lorsque ces sujets sont transplantés en plaine. Réciproquement, le sujet vivant habituellement à basse altitude, pourra présenter lors de son transfert en haute montagne, deux types de réactions : soit des modifications adaptatives identiques à celles que présentent les autochtones ou bien en leur absence, des signes cliniques et biologiques d'intolérance dont on peut retenir la polyglobulie d'inadaptation (142).(277)

En résumé, nous retiendrons le rôle régulateur de l'hémoglobine réduite dans la synthèse du 2-3 DPG et l'activité de l'hexokinase, ces phénomènes s'intégrant dans l'action modulatrice de la voie des trioses, vis-à-vis du transport et surtout de la libération de l'oxygène par l'érythrocyte au niveau des tissus.

Nous poursuivrons ce rapide aperçu de la voie des trioses en mentionnant que la synthèse complète de l'ATP n'a jamais été démontrée dans le globule rouge mûr.

Par contre, il peut le synthétiser à partir d'adénine, de guanine et d'hypoxanthine (132). Nous aborderons ultérieurement plus en détail les voies métaboliques en rapport avec l'utilisation des purines-nucléosides. De plus, deux enzymes ne faisant pas partie de la voie des trioses, peuvent être impliquées dans le métabolisme de l'ATP : l'adénosine désaminase et l'adénylate kinase. Il apparaît que la désamination des adénines nucléotides est très lente lorsque le glucose est présent. Ce fait est expliqué par l'affinité plus grande de l'adénylate kinase, vis à vis de l'AMP et tant que le niveau énergétique est élevé, le niveau d'AMP est très faible (133, 39).

Enfin, l'ATP est largement utilisé par l'ATPase. Au total, le globule rouge, par la voie des trioses, maintient un niveau énergétique suffisant, le rapport $\frac{ATP}{ADP}$ est compris entre 5 et 10 et l'AMP est présent en quantité négligeable.

Enfin, nous avons déjà mentionné que la voie des trioses est jalonnée par deux déshydrogénations : le coenzyme de chacune d'elles étant le NAD*. Les pyridines nucléotides sont probablement synthétisés par le globule rouge mûr. Ils semblent quantitativement suffisants et il n'y aurait pas là un facteur de limitation (134), mais nous reviendrons en détail sur ce sujet qu'il faut envisager plus globalement.

En conclusion, la notion de régulation repose sur celle d'enzyme «rate limiting». Cette conception est en réalité dynamique, et de fait, adaptée à l'environnement métabolique.

Nous ajouterons que l'hétérogénéité métabolique qualitative et quantitative de l'érythrocyte peut rendre complexe l'abord de certaines questions. Nous citerons en exemple le déficit en pyruvate kinase. Ce déficit s'accompagne d'une chute importante de l'ATP. Le niveau d'ATP résiduel provient dans ce cas de la phosphorylation oxydative qui s'effectue au niveau des réticulocytes, ce qui explique l'effondrement de ce résidu par les inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires (131).

* *NAD ou Nicotinamide adénine dinucléotide.*

Au total les besoins en énergie de l'érythrocyte humain sont largement fournis et d'après les calculs théoriques de WITTMAN, la production d'ATP excède son utilisation membranaire dans la régulation osmotique.

Avec BREWER (142) on peut penser alors qu'il est urgent de déterminer la part qui revient au 2-3 DPG et à l'ATP dans la régulation de l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine.

On sait de plus, qu'il semble exister un balancement entre le niveau de chacune de ces substances : le déficit en pyruvate kinase s'accompagne d'un effondrement de l'ATP, avec en général une élévation du taux de 2-3 DPG, qui explique d'ailleurs la tolérance de certains sujets à l'anémie.

Réciproquement, dans le cas de «hauts niveaux d'ATP héréditaires», il y a coïncidence avec une chute du taux de 2-3 DPG.

3) MODIFICATIONS APPORTEES PAR LE VIEILLISSEMENT IN VIVO

Le globule rouge mûr circulant, a perdu toute protéosynthèse. De là, chaque protéine a une demi-vie, dont au total, dépendra la survie de cette cellule. Différentes méthodes ont été utilisées pour obtenir des populations d'érythrocytes de différents âges : soit expérimentales chez l'animal par saignées répétées ou injections d'acétyl phényl hydrazine, soit applicables à un échantillon de sang total humain par différentes méthodes physico-chimiques ou immunologiques. Aucune de ces méthodes n'est parfaite et les résultats varient selon les auteurs.

Toutefois, avec RAMOT & Coll. (135), on peut admettre que l'activité de toutes les enzymes avec le vieillissement, diminue de 50 % environ, sauf l'hexokinase et la pyruvate kinase qui perdent 75 à 80 % de leur activité dans les globules rouges âgés.

Il est probable que l'hexokinase est l'enzyme qui règle le niveau de la glycolyse dans le globule rouge vieillissant. Il y a de plus, coïncidence entre le pH optimum de cette enzyme et celui de la voie des trioses dans son ensemble.

A l'opposé, l'ATPase ne décline pas.

Donc, deux enzymes seraient responsables du bas niveau d'ATP dans le globule rouge âgé : l'hexokinase, dont l'activité a chuté, et l'ATPase, dont l'activité demeure constante.

D'autres modifications du métabolisme érythrocytaire sont associées au vieillissement in vivo. On a décrit des altérations de l'hémoglobine : l'hémoglobine a un taux de saturation plus grand car le taux de 2-3 DPG s'est abaissé (60); il existe en outre des modifications électrophorétiques (136).

Quant l'érythrocyte vieillit, sa densité augmente, le contenu en potassium diminue et le taux de sodium s'élève. Une certaine incapacité pour les vieilles cellules à maintenir leur volume et leur forme pourrait résulter d'une altération du transport de ces électrolytes, et comme conséquence de cette modification de forme, l'érythrocyte pourrait être plus apte à une séquestration et à une destruction (29).

4) VIEILLISSEMENT IN VITRO

Celui-ci est généralement envisagé sur du sang prélevé sur milieu ACD*. Il existe d'abord des modifications immédiates dans l'heure qui suit le prélèvement à température ambiante. Comme l'ont montré CARTIER et LEROUX (22), la chute de pH apportée par la solution ACD, entraîne une inhibition de la phospho-fructo-kinase, avec accumulation en amont, de glucose-6-phosphate et de fructose-6-phosphate, à des taux 2 à 3 frois plus élevés que la normale. Cette inhibition est réversible avec l'alcalinisation du milieu.

Par la suite, on assiste à une chute progressive d'activité des différentes enzymes. Remarquons que la glutathion-réductase s'isole par une stabilité remarquable.

L'étude des différents métabolites intermédiaires (40, 60), montre la diminution de l'ATP, et des différents esters phosphoriques, notamment le 2-3 DPG, au profit de l'augmentation du phosphore inorganique.

Ces modifications sont partiellement réversibles. De longue date, on sait que le globule rouge vieilli de la sorte, est incapable de régénérer son stock d'ATP par incubation à 37°C, en présence de glucose. Par contre, une telle régénération est possible en présence d'inosine ou d'adénosine (40).

De nombreux tests ont été proposés pour apprécier la viabilité des érythrocytes conservés. (137, 138). Il ressort que la résistance aux modifications entraînées par le vieillissement in vitro est variable selon les sujets, et la capacité à maintenir un niveau donné d'ATP dans ces conditions semble héréditaire (25). Par ailleurs, SASS a montré que l'étude de la perméabilité de l'érythrocyte au bleu de méthylène pouvait fournir un critère correct d'appréciation de la viabilité (18, 19).

** ACD : Acide citrique et dextrose.*

CHAPITRE DEUXIEME

METABOLISME REDOX DE L'ERYTHROCYTE

Le métabolisme rédox de l'érythrocyte est complexe, car il doit s'envisager à partir de données simples, reposant sur deux voies métaboliques. Il faut différencier «l'état normal» où de fait, l'érythrocyte arrive à un parfait équilibre entre oxydations et réductions d'une part, et d'autre part, les agressions rédox – pour la majorité oxydantes – où l'érythrocyte accroît considérablement son potentiel réducteur. En fait, il existe à tous les niveaux, normal ou d'agression rédox, une régulation dont les modalités sont difficiles à saisir par l'expérience directe au niveau de l'érythrocyte intact mais non moins véritable.

Par ailleurs, l'intensité de l'agression oxydante n'est pas subordonnée à un paramètre physique comme le potentiel rédox caractéristique de la substance étudiée, mais aux possibilités d'interférences chimiques entre la substance et le métabolisme. Le bleu de méthylène répond parfaitement à ces données, et il semble bien que cette propriété repose non seulement sur le potentiel rédox du bleu, mais surtout sur le fait de son accumulation au niveau de l'érythrocyte qui, maintenu à l'état réduit et en grande quantité, un colorant extrêmement auto-oxydable.

En outre, la notion d'agression oxydante est complexe au niveau de cette cellule ainsi nous citerons le cas de la vitamine C, à la fois capable de produire une réduction directe de la méthémoglobine (et c'est un geste thérapeutique) mais également de produire de l'eau oxygénée de dernier aspect paradoxal au niveau d'un érythrocyte normal. Ces mêmes réserves s'appliquent au bleu de méthylène.

En 1930, WARBURG notait qu'en présence de bleu de méthylène, le catabolisme glucidique érythrocytaire s'effectuait selon une voie oxydative initiée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Enfin, DICKENS et HOPECKER (1) découvrent une voie, qui au niveau de l'érythrocyte, subit une adaptation singulière, presque exclusivement réductrice et que nous allons envisager.

De fait, le métabolisme rédox de l'érythrocyte dépend de la fourniture en co-enzymes de pyridines nucléotides réduits et c'est sous cet aspect, plus global, que nous allons l'envisager.

1 – LA FORMATION DES CO-ENZYMES RÉDUITS –

1 – LA VOIE DES PENTOSES (Fig. 3)

Elle a été décrite par DICKENS et HORECKER.

Elle commence à partir de la voie des trioses, au niveau du glucose-6-phosphate (ou ester de Robison).

Ces deux étapes initiales sont deux réactions de déshydrogénation d'importance capitale pour l'érythrocyte placé dans certaines circonstances oxydantes, impliquant la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD) et la 6-phosphogluconate-déshydrogénase (6PGD). Cette séquence se poursuit par trois réactions d'interconversions catalysées par deux transcétolases et une aldolase et aboutit au niveau de la voie des trioses, par formation de fructose-6-phosphate et de 3-phospho-glycéraldéhyde (Fig. 3).

Son rôle est ici tout à fait différent de celui qu'elle joue dans les cellules nucléées. Au niveau de l'érythrocyte, elle aboutit à la production de nicotinamide adénine dinucléotides phosphates réduits, utilisés uniquement comme moyen de lutte contre les agressions oxydantes.

Elle représente une voie d'exception, et à l'état normal, 10 % seulement du glucose métabolisé emprunte ce shunt.

2 – LA VOIE DES TRIOSES

De fait, la voie des trioses ne comporte qu'une seule étape oxydative : la déshydrogénation du 3-phospho-glycéral-déhyde avec formation de $NADH_2$.

2 – UTILISATION DES CO-ENZYMES RÉDUITS –

En l'absence de chaîne respiratoire (le globule rouge adulte ne respire pas), la réoxydation des co-enzymes réduits s'opère grâce à un transfert d'hydrogène sur certains substrats : le pyruvate, le glutathion oxydé et la méthémoglobine.

1 – LE PYRUVATE

Grâce à la lactico déshydrogénase (LDH), il est transformé en lactate en acceptant l'hydrogène du $NADH_2$. Ce système peut être considéré comme couplé avec celui de l'oxydation du 3-phospho-glycéral-déhyde (Fig. 5). Dans ces conditions, le bilan rédox de la voie des trioses est nul.

2 – LE GLUTATHION REDUIT (GSH) : est présent dans le globule rouge au taux de 60 à 80 mg/100 ml de cellule.

La fraction oxydée (GSSG) ne représente normalement que 5 à 10 % du total. Le maintien du GSH à l'état réduit est assuré par la glutathion réductase, enzyme de nature flavo-protéique qui semble utiliser préférentiellement le $NADPH_2$. Cette réaction pourrait constituer la principale voie de réoxydation du $NADPH_2$ dans le globule rouge (Fig.6)

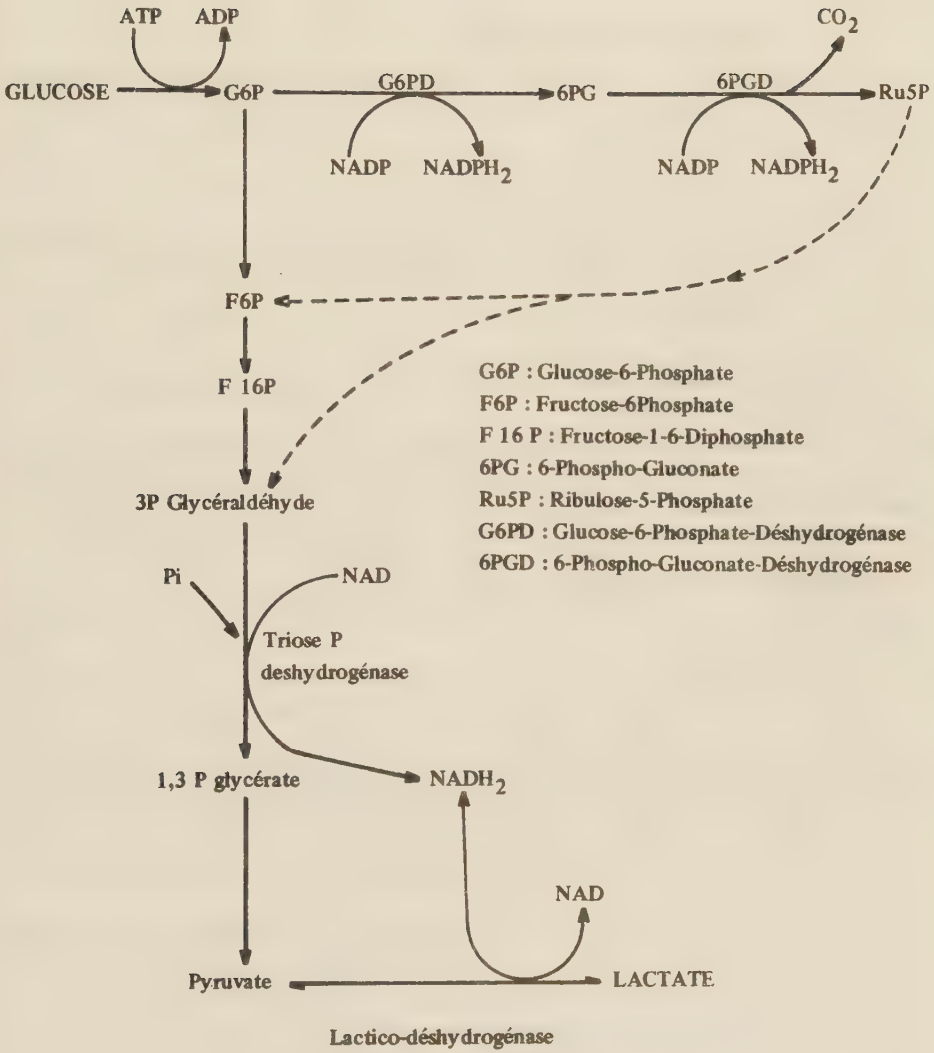


FIGURE 5 – Métabolisme du glucose dans le globule rouge.

3 – LA METHEMOGLOBINE

A – Les modalités d'oxydation du pigment

La méthémoglobine est une forme oxydée de l'hémoglobine où le fer de l'état ferreux (Fe^{++}) est passé à l'état ferrique (Fe^{+++}) impropre à jouer son rôle de transporteur de l'oxygène moléculaire.

Il existe à l'état normal une méthémoglobinisation spontanée in vivo de l'érythrocyte dont le mécanisme n'est pas connu (5 % par jour).

Par ailleurs, lorsqu'on réalise au laboratoire une méthémoglobinisation des érythrocytes, in vitro, il faut avec SCOTT (100), différencier trois mécanismes :

1) L'Oxydation directe :

Elle est produite par une substance dont le potentiel rédox se situe au-dessus de celui de l'hémoglobine (Fig. 7).

Le 2-6 dichlorophénol indophénol rentre dans ce cas. Mais l'oxygène n'est pas un bon exemple, car au niveau de l'érythrocyte intact, l'oxydation est très lente et elle ne se produit vraiment que dans des circonstances non physiologiques : au sein de l'hémolysat. A ce sujet, nous pouvons écouter ce que nous dit PERUTZ (149) :

«Le site actif de l'enzyme est situé dans une cavité formée par la chaîne polypeptidique : ainsi les groupes hèmes de l'hémoglobine sont situés dans les cavités ou poches formées par la globine.

Cet environnement n'a pas été déterminé dans tout son détail et dans toute sa portée, mais sa fonction peut être comprise par des bases physiques générales. Le problème chimique de la fonction de l'hémoglobine réside dans l'existence même d'un environnement permettant la combinaison de l'atome de fer ferreux avec l'oxygène moléculaire, sans pour cela qu'il soit oxydé. Une oxydation, si elle se produisait impliquerait le transfert d'un électron de l'atome de fer de l'état ferreux à l'état ferrique.

Le travail de séparation des charges ne s'exercerait que faiblement en milieu aqueux, de constante diélectrique élevée.

Par contre, il serait intense en milieu non aqueux, d'une constante diélectrique inférieure de vingt fois au minimum. En fait, cette oxydation ne se produit pas ; l'oxygène doit rendre son électron à l'atome de fer avant qu'il puisse s'échapper.

L'environnement non aqueux de la globine inhibe l'oxydation de l'atome de fer. Une combinaison réversible du fer ferreux avec l'oxygène moléculaire devient possible».

2) L'oxydation par l'oxygène grâce à un intermédiaire :

Celui-ci peut être représenté par le bleu de méthylène. L'oxydation directe est impossible, car son potentiel rédox est inférieur à celui de l'hémoglobine (Fig. 7). Mais le colorant pourrait réagir rapidement et de manière réversible avec l'hémoglobine et l'oxygène selon un mécanisme qui n'est pas encore très clair.

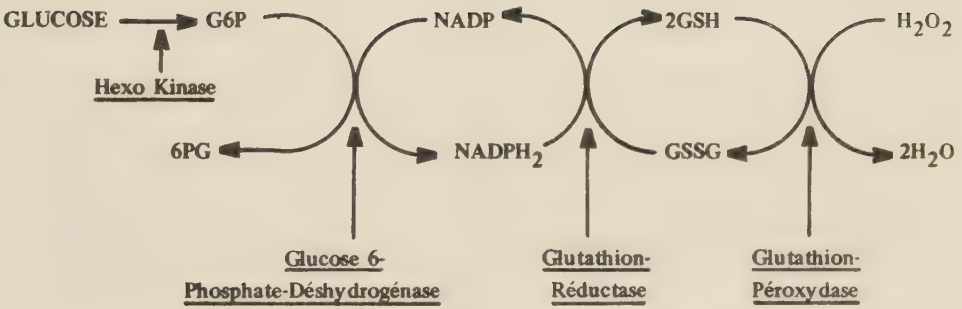


FIGURE 6 – REACTION D'OXYDOREDUCTION INTERESSANT LE GLUTATHION REDUIT DANS LE GLOBULE ROUGE.

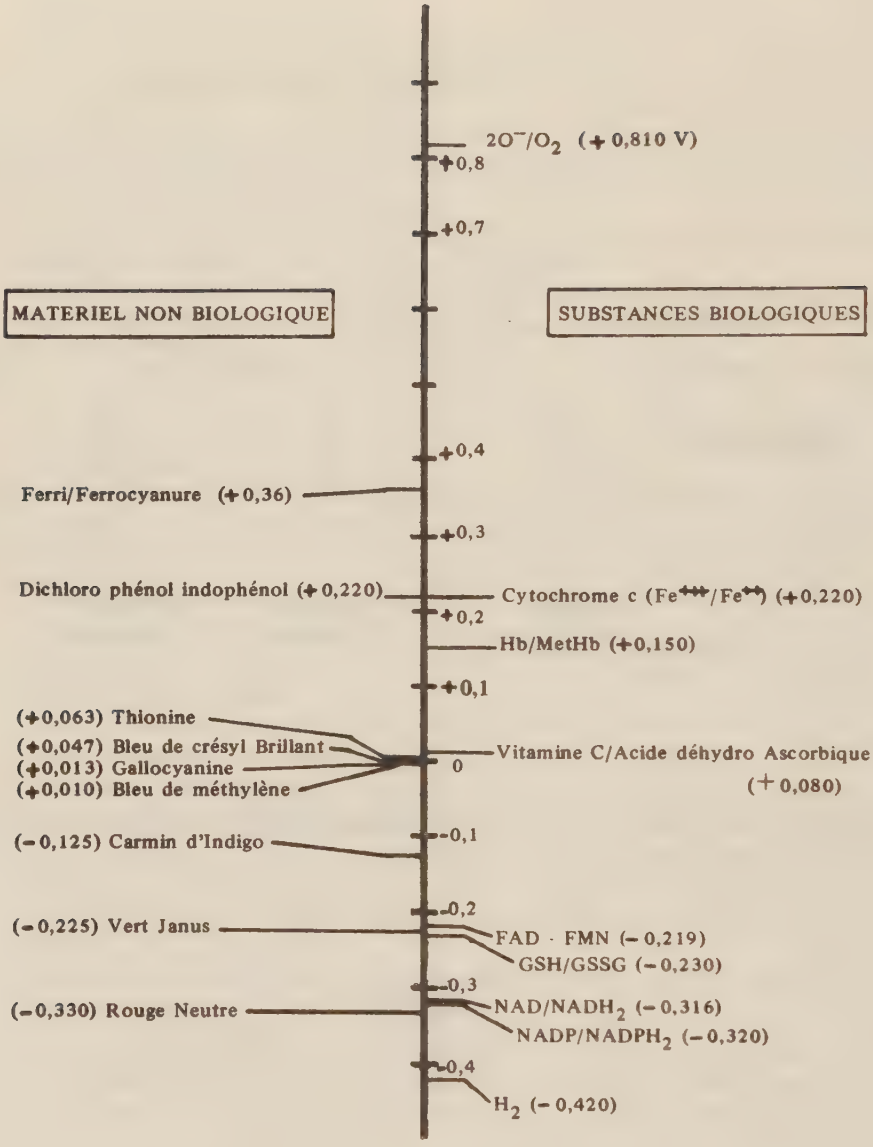


FIGURE 7 – ECHELLE DES POTENTIELS REDOX (E'. pH 7 en Volt) DE DIFFERENTS SYSTEMES BIOLOGIQUES ET ARTIFICIELS.

3) La formation d'un complexe :

Les substances de ce groupe se fixent sur l'hémoglobine. Il en résulte un complexe modifiant les propriétés de l'hémoglobine et notamment facilitant son oxydation par l'oxygène moléculaire.

Nous trouvons dans ce cas le nitrite de soude, mais aussi le ferricyanure, comme l'a montré HEGESH (97, 98).

L'hémoglobine se trouvant dans cette forme instable, serait plus facilement oxydée , mais réciproquement, la méthémoglobine ainsi obtenue présenterait la même instabilité vis à vis de la réduction qui serait plus facile.

Cette notion semble se retrouver aussi au niveau des hémoglobinoses M (160). Ces considérations nous servirons ultérieurement à clarifier quelques résultats expérimentaux.

De plus, en ce qui concerne l'effet oxydant de certains toxiques, il faut établir une distinction entre l'oxydation simple de l'hème en méthémoglobine (comme nous venons de le décrire), processus réversible, et destruction oxydative lésant irréversiblement à la fois l'hème et la globine et aboutissant à la formation de choléglobine. C'est ce dernier type d'oxydation qui rend compte de l'action de certains toxiques comme l'acétyl phényl hydrazine, et dont la formation des corps de HEINZ est la manifestation cytologique. Chez le sujet normal, la méthémoglobinémie ne dépasse pas 4 % de la totalité du pigment. Ce résultat provient de la mise en jeux de systèmes réducteurs que nous allons envisager.

B – La réduction de la méthémoglobine

Nous allons successivement mettre en place les différents systèmes impliqués dans la réduction de la méthémoglobine. Nous envisagerons alors les voies d'abord métaboliques et les mécanismes qu'elles supposent au niveau de l'érythrocyte intact, enfin, nous aborderons le problème encore imparfaitement résolu de la nature des enzymes et de la séquence exacte des chaînes de transport impliquées dans la réduction de ce pigment.

a) Le système des méthémoglobines-réductases .

Il existe dans le globule rouge deux systèmes enzymatiques capables de réduire la méthémoglobine, différant tant par leur spécificité co-enzymatique, que par leur signification physiologique.

Le premier est une $NADH_2$ méthémoglobine-réductase (Fig. 8). Elle est capable de transférer l'hydrogène du $NADH_2$ sur un accepteur dont le potentiel d'oxydo-réduction est plus élevé, comblant le hiatus électronique qui les sépare. Un tel hiatus existe entre le système $NAD/NADH_2$ et le système méthémoglobine/hémoglobine (Fig. 7).

Cet enzyme a été mis en évidence par GIBSON (147), et il a été purifié par SCOTT (148), mais nous reviendrons ultérieurement sur sa nature.

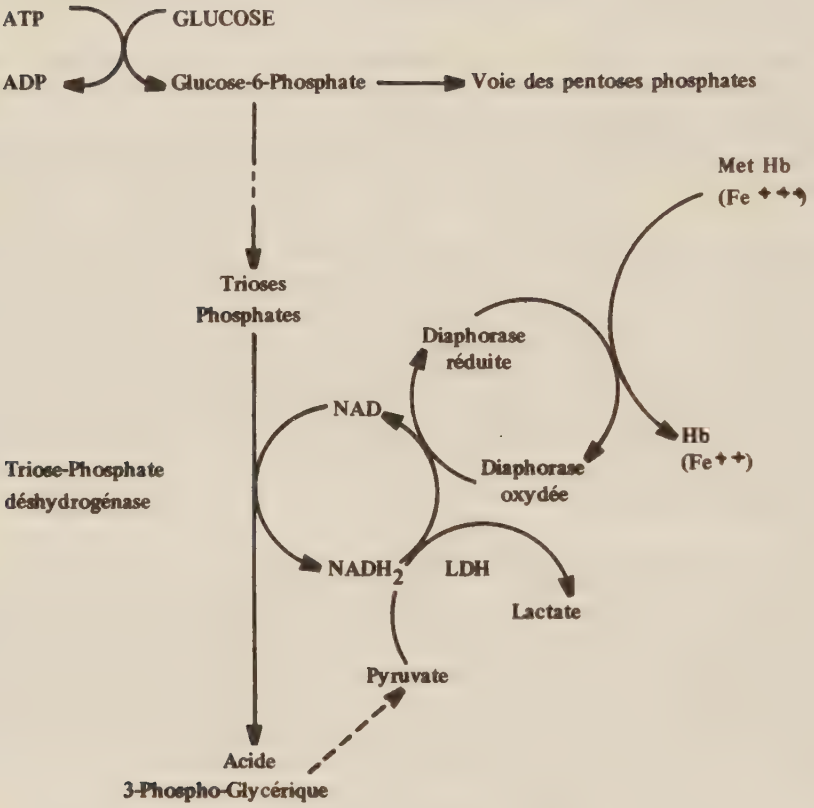


FIGURE 8 – ROLE DU $NADH_2$ DANS LE GLOBULE ROUGE. (D'après KAPLAN). (LDH : Lactico-Déshydrogénase).

Le second enzyme est une méthémoglobine réductase capable de transférer les électrons du $NADPH_2$ sur la méthémoglobine, mais seulement en présence d'un intermédiaire d'oxydo-réduction artificiel comme le bleu de méthylène, le bleu de toluidine, ou le bleu de nil, et aucun co-facteur naturel connu ne serait susceptible de le remplacer au niveau de l'hémolysat (Fig. 9).

Au total, nous avons décrit les chaînes métaboliques présentes dans l'érythrocyte mûr et nous avons rapidement mis en place les différents systèmes de couplage redox.

Il devient alors évident que la réduction de la méthémoglobine sous-entend la nécessité de régénération des pyridines nucléotides réduits, c'est à dire d'un métabolisme des sucres. On doit en outre noter que cette réduction suppose l'intégrité de l'hématie, car dans les mêmes conditions, elle devient nulle au niveau de l'hémolysat.

Il devient clair que l'efficience plus ou moins grande d'un substrat vis à vis de cette réduction dépendra de trois facteurs : du nombre et de la vitesse des réactions nécessaires pour aboutir à la formation de pyridines nucléotides réduits, mais aussi des caractères cinétiques de la réaction finale de réduction, et avant tout, de la vitesse de pénétration du substrat dans l'érythrocyte.

Nous pouvons classer les voies d'abord métabolique, en deux catégories : l'une principale avec des substrats tels que le glucose, le lactate et les purines nucléosides, et l'autre, accessoire. Cette dernière nous permettra de décrire quelques activités enzymatiques résiduelles au niveau de l'érythrocyte mûr

b) Voies d'abord métabolique, principales :

Les figures 10, 11, 12, montrent la réduction de la méthémoglobine en présence de divers substrats. Celle-ci est plus ou moins rapide et dépend des différentes séquences métaboliques, que du même coup, on explore :

– en présence de glucose. Sans bleu (Fig. 10).

Il y a production de $NADH_2$ par la voie des trioses et réduction par la NADH diaphorase.

– avec glucose et avec bleu (Fig. 10)

Il y a production de $NADPH_2$ par les deux premières réactions de la voie des pentoses. La réduction s'opère par l'intermédiaire de la $NADPH_2$ diaphorase en présence du colorant.

Nous remarquerons que dans un cas, comme dans l'autre, l'hexokinase est nécessaire ; enfin, la réduction en présence du colorant redox est considérablement plus rapide.

– en présence de lactate. Sans bleu (Fig. 11).

Une seule réaction est nécessaire à la production de $NADH_2$ et elle suppose l'intégrité de la lactico-deshydrogénase. La réduction s'opère avec la $NADH_2$ diaphorase.

– en présence de lactate. Avec bleu (Fig. 11).

On constate toutefois une minime accélération de la réduction de la méthémoglobine, sans que ce phénomène ait reçu d'explication. RAPPOPORT signale cependant

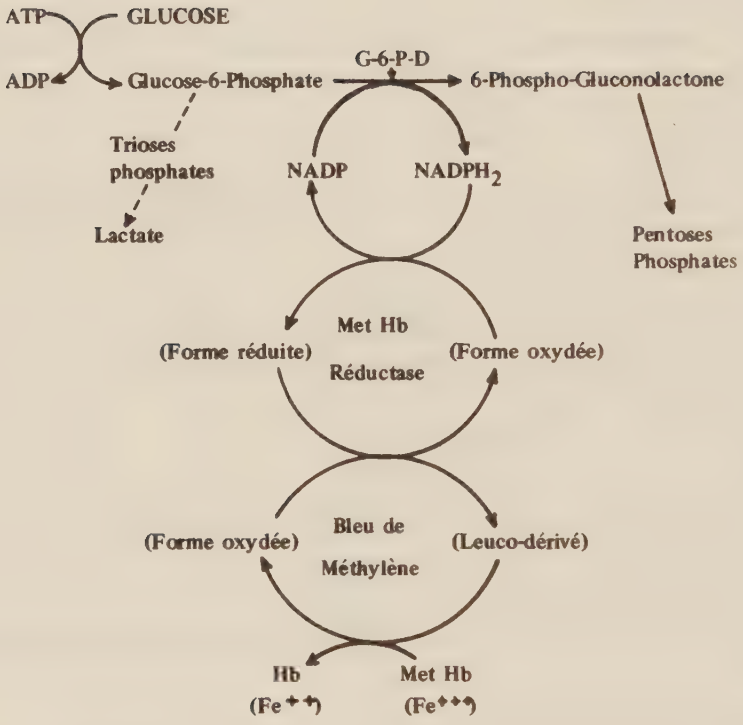


FIGURE 9 – REDUCTION DE LA METHEMOGLOBINE PAR LA VOIE $NADPH_2$ DEPENDANTE (en présence d'un intermédiaire d'oxydo-réduction : le Bleu de Méthylène). (D'après KAPLAN).

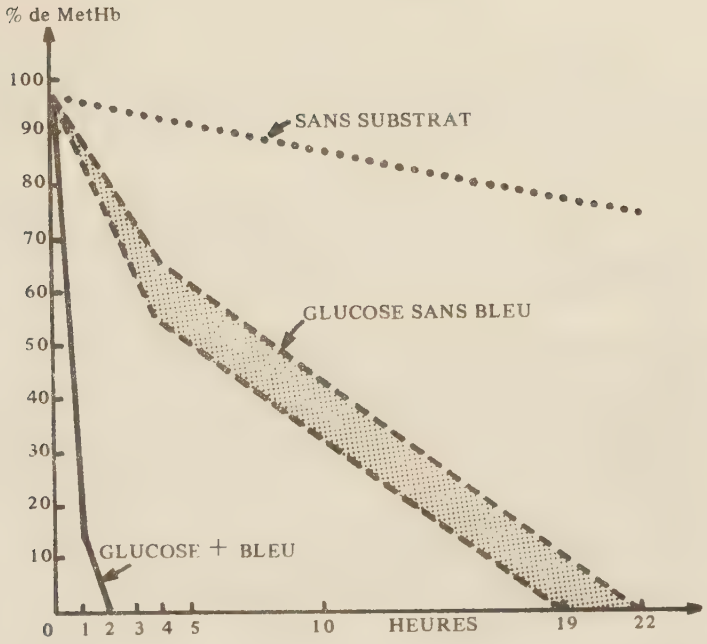


FIGURE 10 – REDUCTION EN PRESENCE DE GLUCOSE

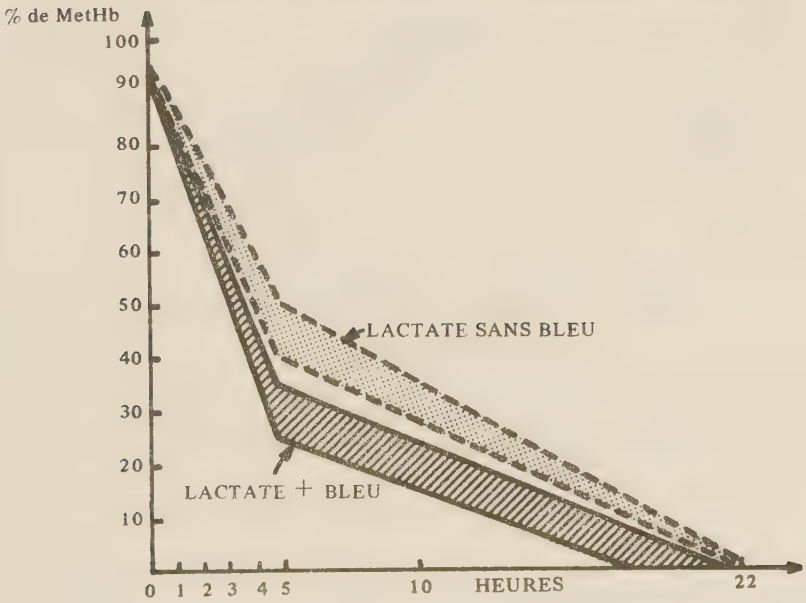


FIGURE 11 – REDUCTION EN PRESENCE DE LACTATE

REDUCTION DE LA METHEMOGLOBINE AU NIVEAU DE L'ERYTHROCYTE EN PRESENCE D DIVERS SUBSTRATS (D'après KAPLAN).

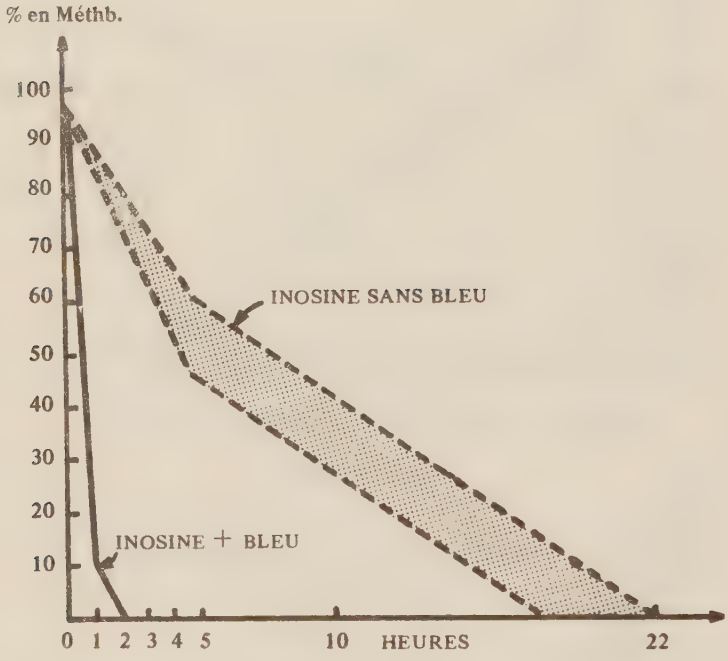


FIGURE 12 – REDUCTION EN PRESENCE D'INOSINE DE LA METHEMOGLOBINE

une activité lactico-déshydrogénasique à NADP dans le globule rouge (150) ; les expériences d'autres auteurs laissent peut-être supposer l'existence d'une transhydrogénase (24).

– en présence de purines nucléosides.

Ce cas nous retiendra plus longtemps.

En 1955, HUENEKENS démontrait l'existence d'une purine nucléoside phosphorylase dans l'érythrocyte.

Cette enzyme est capable, en présence de phosphate inorganique, de scinder l'inosine en hypoxanthine et ribose-1-phosphate. Puis le pentose phosphate subit l'action d'une phospho-ribo-mutase qui le transforme en ribose-5-phosphate qui rejoint la voie de DICKENS HORECKER. Outre l'inosine, la purine nucléoside phosphorylase est capable de cliver la guanosine.

L'utilisation de l'adénosine peut se faire après action de l'adénosine désaminase qui la transforme en inosine ; celle de la xanthosine est inconnue ; après amination, elle pourrait peut-être conduire à la guanosine (Fig. 13). Au total l'érythrocyte métabolise la fraction riboside des purines nucléosides mais nous ignorons le devenir des bases puriques ainsi libérées.

A ce sujet, nous noterons que le globule rouge humain présente des quantités assez importantes d'acide urique dont on ignore la provenance et le rôle. Toujours est-il que jusqu'à ce jour, on n'a encore décrit aucune activité xanthine-oxydase au niveau de l'érythrocyte et il serait alors abusif de supposer un devenir oxydatif au niveau des bases puriques. Nous reprendrons cette question plus tard.

Quoi qu'il en soit, l'érythrocyte est capable de réduire la méthémoglobine en présence de purines nucléosides. Nous pouvons prendre comme exemple l'inosine (Fig. 12).

- Avec inosine. Sans bleu.

La fig. 12 nous a montré les séquences qui aboutissent au ribose-5-phosphate. Ce métabolite suit la voie des pentoses puis celle des trioses où se situe l'étape oxydative. Le couplage s'effectue alors avec la $NADH_2$ diaphorase.

- Avec inosine et avec bleu (Fig. 12).

Elle implique les séquences précédemment décrites avec l'inosine sans bleu, mais en outre, arrivé aux métabolites terminaux de la voie des pentoses il y a une remontée de la voie des trioses jusqu'au glucose-6-phosphate qui va alimenter les deux déshydrogénases de la voie des pentoses et la $NADPH_2$ diaphorase. Nous noterons enfin que l'hexokinase n'est pas impliquée dans cette réduction.

– Le cas de la vitamine C :

L'acide ascorbique est capable de réduire la méthémoglobine, sans participation d'enzymes et à des concentrations physiologiques expliquant l'effet réducteur direct du plasma sur une solution de méthémoglobine.

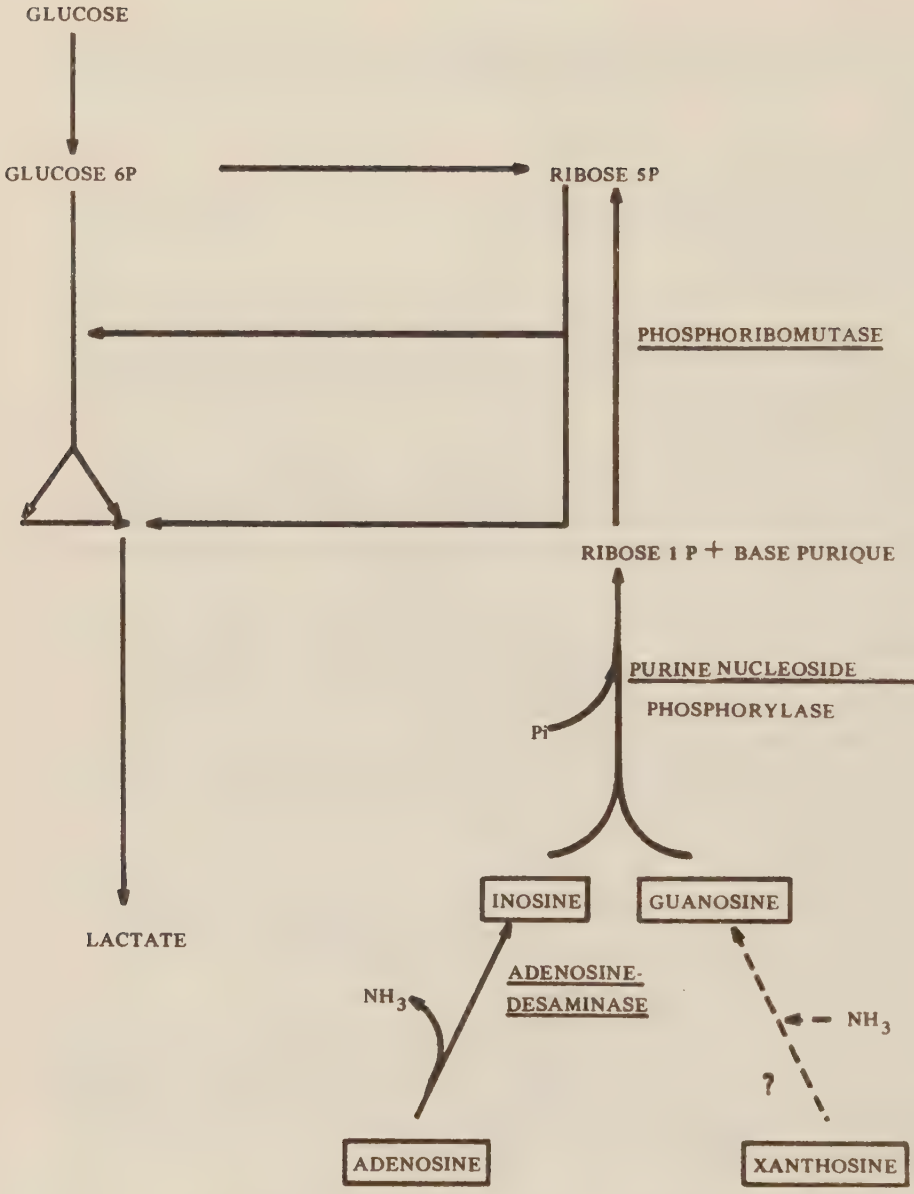


FIGURE 13 – UTILISATION DES PURINES NUCLEOSIDES PAR L'ERYTHROCYTE.

En conclusion, quel que soit le substrat, on peut retenir qu'en présence de bleu, il se produit une dérivation considérable de l'utilisation du glucose-6-phosphate vers la voie des pentoses, celle-ci aboutissant à la libération de quantités importantes de $NADPH_2$ qui, en présence du colorant et d'un système à activité, $NADPH_2$ diaphorase réduit très rapidement la méthémoglobine.

A l'opposé, en l'absence de bleu, la principale source de pyridine nucléotides réduits, $NADH_2$ essentiellement, est située à deux niveaux sur la voie des trioses dont l'activité est largement prépondérante, et la réduction ici très lente, s'effectue à l'aide d'un système à activité $NADH_2$ diaphorase.

c) Substrats accessoires dans la réduction de la méthémoglobine par l'érythrocyte.

Nous citerons le fructose, le glycéraldéhyde (88), le mannose et le galactose (90) ; le formaldéhyde (81), ainsi que d'autres aldéhydes aromatiques ou aliphatiques (82). L'utilisation de l'acide fumarique ou de l'acide malique (89), nous montre la persistance à l'état de vestige de deux enzymes du cycle de Krebs : la fumarase et la malico-déshydrogénase, au niveau de l'érythrocyte mûr.

Enfin, les pyrimidines ribosides ; différents intermédiaires phosphorylés de la glycolyse ; le D lactate de soude et le glutathion réduit, sont totalement inaptes à produire une réduction au niveau de l'érythrocyte méthémoglobinisé (76).

Remarquons toutefois, que parmi ces substances, seul le glutathion réduit est capable de réduire directement le pigment au niveau de l'hémolysat (151).

Au terme de l'énumération des différents substrats utilisés par l'érythrocyte intact réduisant la méthémoglobine, nous devons retenir, compte-tenu des conditions physiologiques deux substrats : le glucose et l'acide lactique.

Chemin faisant, cette étude nous a montré les grandes lignes de cette réduction, ainsi devront être précisés le rôle et le rapport des deux systèmes à activité $NADH_2$ et $NADPH_2$ méthémoglobine réductase, du glutathion réduit et de la vitamine C.

C – Les méthémoglobines réductases

Les méthémoglobines réductases représentent un système dont la multiplicité des formes moléculaires prête encore à discussion ; les structures isolées ayant une activité variable avec les deux types de co-enzymes : $NADH_2$ et $NADPH_2$.

Nous avons déjà schématiquement exposé l'opposition entre une activité $NADH_2$ méthémoglobine réductase connectée avec la voie des trioses et une activité $NADPH_2$ méthémoglobine réductase en rapport avec la voie des pentoses et nécessitant un transporteur artificiel du type bleu de méthylène.

On réserve habituellement le terme de diaphorase aux systèmes qui permettent la réduction d'un accepteur artificiel comme le bleu de méthylène mais qui ne permettent pas la réduction du cytochrome C ou de l'oxygène (155).

Toutefois, l'utilisation du terme plus court de diaphorase a prévalu sur celui de méthémoglobine réductase et nous emploierons le premier, en précisant lorsqu'il sera nécessaire, le type d'accepteur terminal.

Les diaphorases de l'érythrocyte peuvent être impliquées dans différentes chaînes redox, naturelles ou artificielles, qui ont été mises à profit pour doser leur activité. En présence de $NADH_2$ ou de $NADPH_2$, on peut suivre la décoloration du dichlorophénol indophénol. La réduction de ce composé est 10 000 fois plus rapide que celle de la méthémoglobine.

La méthémoglobine peut aussi être accepteur final d'électron dans deux cas : en présence de $NADH_2$ (ou de $NADPH_2$), et de BM(100) ou directement par le $NADH_2$ seul dans certaines circonstances où la méthémoglobine* est plus facilement réduite (97, 98).

Enfin, le BM peut être l'accepteur final dans des conditions d'anaérobiose. Citons accessoirement une activité cytochrome C réductase et ménadione réductase (95).

La séquence exacte de la réduction de la méthémoglobine en présence de BM n'est pas claire.

Le $NADPH_2$ est capable de réduire le BM, directement en anaérobiose (a). En aérobiose, on constate uniquement une consommation de NADP réduit sans réduction du colorant qui est très auto-oxydable (a + b). Enfin, il existe une réduction non enzymatique de la méthémoglobine en présence de BM et de $NADPH_2$ (a + c) (106) ; Ces phénomènes de réduction non enzymatique se résument dans les équations suivantes :

$$BM + NADPH_2 \rightarrow BMH_2 + NADP \quad (a)$$

$$2\,BMH_2 + O_2 \rightarrow 2\,BM + 2\,H_2O \quad (b)$$

$$BMH_2 + Hb^{+++} \rightarrow Hb^{++} + BM \quad (c)$$

En présence des diaphorases, avec du $NADPH_2$, le problème se pose de savoir si elles peuvent être réduites par le leuco-BM (BMH_2) qui résulte de la réaction non enzymatique entre le $NADPH_2$ et le BM (101), (équation 1), ou si elles peuvent catalyser la réduction du BM en leuco dérivé (157, 53), (équation 2). Cette double alternative se trouve résumée dans les deux équations suivantes :

(1) $NADPH_2$ — BM ⇄ Diaphorase réduite — Hb^{+++}

NADP — BMH_2 ⇄ Diaphorase oxydée — Hb^{++}

ou

(2) $NADPH_2$ — Diaphorase oxydée ⇄ BMH_2 — Hb^{+++}

NADP — Diaphorase réduite ⇄ BM — Hb^{++}

Quelques arguments semblent indiquer que la deuxième équation est plus conforme à la réalité.

– La réduction du BM en anaérobiose par le $NADPH_2$ est accélérée par l'addition de l'hémolysat (106) ;

** Sous la forme d'un complexe avec le ferricyanure et à pH acide.*

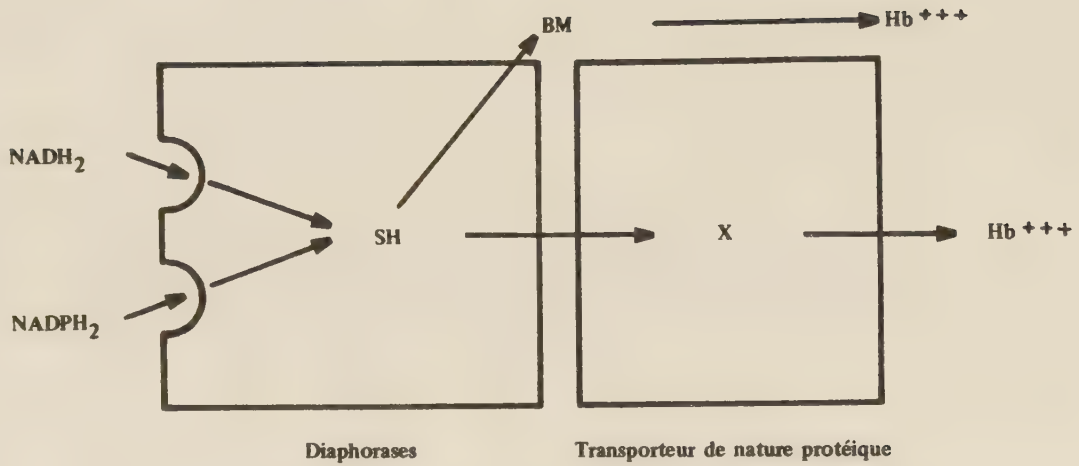


FIGURE 15 – Schéma de la chaîne de transport de la réduction de la méthémoglobine selon HUENNEKENS. Les 3 diaphorases isolées par cet auteur possèdent chacunes 2 sites actifs : l'un pour le $NADH_2$, l'autre pour le $NADPH_2$; de plus, une fonction SH est indispensable. Le BM est l'accepteur intermédiaire, qui se réoxyde spontanément et rapidement au contact de la méthémoglobine. En son absence, la chaîne de transport se poursuit par un intermédiaire, X, qui contient peut-être du fer (100).

FIGURE 16 – Schéma proposé par TOWNES.

L'hémoprotéine a été isolée (171, 172, 173). – Elle ne peut pas être réduite directement par les pyridines nucléotides réduits. Ces derniers peuvent la réduire en présence de BM et l'on suppose qu'un facteur X intermédiaire remplace le BM in vivo. L'hémoprotéine réduite peut se réoxyder à son tour avec l'oxygène ou la méthémoglobine.

– Le maintien du BM à l'état réduit,* au niveau du globule rouge intact implique non seulement la fourniture de $NADPH_2$ par la voie des pentoses, mais aussi la présence de la NADPdiaphorase comme en témoigne le déficit en cette enzyme (107).

Mais si la réduction du BM par la NADPdiaphorase semble une séquence probable, il n'est pas du tout certain qu'il n'existe pas un autre intermédiaire (plus ou moins efficace), entre le leuco bleu et la méthémoglobine.

Le schéma de HUENNEKENS que nous reproduisons (Fig. 15), évoque une réduction directe non enzymatique du pigment oxydé par le leuco bleu (100).

Quoi qu'il en soit, la réduction non enzymatique de la méthémoglobine par du leuco BM est un phénomène qui dans l'état actuel de nos connaissances, paraît très probable. On peut constater en effet la réduction d'une solution de méthémoglobine par des érythrocytes ayant accumulé et réduit du BM (53).

Mais il existe peut-être en outre un transporteur intermédiaire de nature héminique selon le schéma proposé par TOWNES (Fig. 16) et dont le déficit héréditaire entraînerait une variété particulière de méthémoglobinémie (158, 159).

Au total, la nature des chaînes redox ne nous est pas connue. Il est possible que l'hémolyse entraîne la désorganisation d'un arrangement multi-moléculaire précis, aggravé peut-être par la libération d'enzymes protéolytiques.

Si l'abord des séquences redox précédentes ne nous a pas permis de tirer une conclusion définitive nous allons voir qu'il en est de même en ce qui concerne la nature moléculaire unique ou multiple des deux activités $NADH_2$ et $NADPH_2$ méthémoglobine réductase.

SCOTT, après chromatographie (95), isole 4 types moléculaires :

– 2 $NADPH_2$ diaphorases A et B, très voisines quant à leurs propriétés avec un taux d'activité très faible avec le $NADH_2$.

– 2 $NADH_2$ diaphorases I et II, très différentes l'une de l'autre.

HUENNEKENS (100), isole par chromatographie sur DEAE cellulose, 3 fractions dont le rapport d'activité avec le $NADH_2$ et le $NADPH_2$ est constant.

HEGESH (99), isole une seule fraction à activité ferrihémoglobine réductase prépondérante avec le $NADH_2$.

FUMIO KUMA (153), isole 3 fractions, et il semble que la diaphorase A de KUMA corresponde à la diaphorase I de SCOTT, toutes deux impliquées dans le déficit héréditaire en $NADH_2$ diaphorase.

Au total, l'absence de cohérence dans ces données peut être due à des techniques de préparations différentes certes, mais aussi de dosages différents quant à la nature de l'accepteur final utilisé dans l'appréciation de l'activité au niveau de toutes les fractions éluées.

En dernier lieu, il serait intéressant de préciser le rôle exact de l'ion phosphate dans la prévalence de l'un ou de l'autre de ces systèmes. Seule l'activité $NADH_2$ diaphorase, semble nécessiter cet ion, soit au niveau de l'hémolysat, soit au niveau des fractions issues de chromatographies (100, 153, 156).

* *Nous envisagerons ultérieurement plus en détail, le phénomène d'accumulation de BM par l'érythrocyte.*

En conclusion, la réduction enzymatique de la méthémoglobine fait intervenir deux systèmes : l'un qui serait peut-être le vestige d'une chaîne mitochondriale nécessitant le $NADPH_2$ et réduisant le pigment à condition que du BM soit présent, l'autre représenterait «*l'enzyme normale de la réduction de la méthémoglobine*» à partir du NADH au niveau de l'érythrocyte placé dans des conditions normales.

Nous ajouterons pour terminer, que la réduction de la méthémoglobine peut se faire directement par le glutathion réduit, ou par la vitamine C qui se transforme en Acide déhydro-ascorbique. Ce dernier composé pouvant se réduire à nouveau au contact du glutathion réduit.

Toutefois, ces phénomènes ne représentent qu'un faible appoint : on n'observe pas de méthémoglobinémie dans le scorbut, dans le déficit en G6PD ou en glutathion synthétase ou en NADPH méthémoglobine réductase. Seul le déficit en $NADH_2$ diaphorase entraîne une élévation du taux de méthémoglobine.

4) La lutte contre la formation d'eau oxygénée

L'érythrocyte possède deux enzymes capables de lutter contre la formation d'eau oxygénée.

A – La Catalase

– A forte concentration en eau oxygénée, elle la décompose suivant la réaction :

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

– A faible concentration en eau oxygénée, elle serait capable de détoxiquer le globule rouge en péroxydant un accepteur selon la réaction :

$$H_2O_2 + 2\,R\text{-}OH \rightarrow 2\,H_2O + 2\,R{=}O$$

La catalase est une hémoprotéine et comme telle, inhibée par l'azoture de soude ou le cyanure.

B – La glutathion Péroxydase

Elle permet la détoxication de l'eau oxygénée à la faveur d'une péroxydation du glutathion réduit en glutathion oxydé. La régénération du tripeptide à l'état réduit est assurée par la glutathion réductase en présence de $NADPH_2$ fourni par l'oxydation du glucose-6-phosphate (Fig. 6).

3 – ROLE DES SYSTEMES D'OXYDO-REDUCTION DANS LE GLOBULE ROUGE –

Les systèmes enzymatiques qui viennent d'être décrits sont peu nombreux ; on ne possède à l'heure actuelle, que des vues fragmentaires sur leurs rôles et la manière dont ils sont articulés dans le globule rouge vivant. Les pyridines nucléotides, réduits à l'issue du catabolisme du glucose doivent-être constamment réoxydés et il existe un état d'équilibre dynamique entre les formes réduites et les formes oxydées qui concourent au maintien de ce qu'on a appelé «*le potentiel réducteur intra-érythrocytaire*»

Ce potentiel réducteur est nécessaire pour protéger l'hémoglobine et les protéines enzymatiques contre l'oxydation ; le glutathion réduit interviendrait bien plus dans la protection des groupements thiols de l'hémoglobine et de certaines enzymes, que dans la réduction de la méthémoglobine.

Enfin, il est possible que le processus de méthémoglobinisation spontanée participe à cet équilibre; à un excès de pyridine nucléotides réduits, pourrait correspondre un surcroît d'oxydation du pigment.

Réciproquement, lorsque le globule rouge est mis au contact d'un oxydant – toxique ou médicamenteux – la demande en pyridine nucléotides réduits peut devenir importante et urgente ; il est remarquable de constater que l'érythrocyte puisse très rapidement mettre en jeu ses processus de lutte, car après une seule réaction enzymatique impliquant l'hexokinase et dérivant le métabolisme en direction de la voie des pentoses, l'érythrocyte dispose immédiatement de réactions génératrices de $NADPH_2$, de la possibilité de réduire le glutathion, de péroxyder éventuellement ce composé pour détruire l'eau oxygénée et de l'action d'une $NADPH_2$ méthémoglobine réductase.

L'intensité avec laquelle la voie des pentoses est stimulée, n'est pas en relation proportionnelle avec le potentiel redox de l'oxydant qu'on utilise. De plus, certaines substances comme l'acétyl phényl hydrazine peuvent entraîner des lésions irréversibles ou des inhibitions enzymatiques, comme c'est le cas de la nitro-furantoïne vis à vis de la G6PD (139).

Une phénothiazine : le bleu de méthylène, apparaît au premier rang de la liste des substances capables d'une telle stimulation.

On peut penser que cette donnée repose sur trois propriétés du bleu de méthylène :

- son potentiel redox (+ 0,010 v)
- son caractère d'extrême auto-oxydabilité
- son accumulation en grande quantité au niveau de l'érythrocyte

A la lumière des lignes qui précèdent, nous pouvons envisager alors plus en détail l'incidence métabolique du bleu de méthylène.

CHAPITRE TROISIEME

PLACE DU BLEU DE METHYLENE DANS LE METABOLISME ERYTHROCYTAIRE

La voie des pentoses représente au niveau de l'érythrocyte, le seul mécanisme oxydant le glucose avec libération de CO_2 et génération de $NADPH_2$.

Le principal facteur contrôlant la voie des pentoses est la demande en $NADPH_2$. On a démontré que des colorants redox tel que le bleu de méthylène (BM), agissant comme accepteurs d'électrons venant du $NADPH_2$, sont capables d'activer cette voie au niveau de l'érythrocyte (3, 4, 5, 6), mais aussi au niveau d'autres tissus (foie, glande mammaire). Ce processus est général, et la stimulation de la voie de Dickens Horecker par le pyruvate au niveau de l'épithélium cornéen de bovidés, ou par l'insuline sur la glande mammaire de rat, ou les sels d'ammonium sur la levure a été imputé au fait qu'on a fourni un substrat qui nécessite du $NADPH_2$ pour être métabolisé ou qui stimule les systèmes enzymatiques qui utilisent du $NADPH_2$ (139).

I – LES MODALITES DE LA STIMULATION DE LA VOIE DES PENTOSES EN PRESENCE DE BM –

Avec SZEINBERG et MARKS (139), nous noterons d'emblée que cette stimulation n'existe que sur une hématie intacte. Toutefois, la perte de cette propriété semble en rapport avec la faible activité de l'hexokinase au niveau de l'hémolysat (3).

Les méthodes d'étude sont principalement basées sur l'analyse micromanométrique à l'appareil de WARBURG : on peut étudier la consommation d'oxygène, la libération de CO_2 ou encore le dégagement de CO_2 radioactif à partir de glucose marquée au C_{14} : seul ce dernier procédé est étroitement spécifique.

1 – LA CONSOMMATION D'OXYGENE

En l'absence de BM, on note une très faible consommation d'O_2 de 0 à 5 microlitres/heure/ml de cellules (3).

En fait, cette consommation de base semble s'annuler au bout d'une heure (Fig. 17) et il est possible qu'une grande part de cette consommation ne représente que la saturation progressive en O_2 de l'hémoglobine.

En présence de BM, il existe une stimulation considérable de la consommation en O_2, celle-ci dépendant de la concentration en BM (Fig. 17.)

2 – LA LIBERATION DE CO_2

BRIN et YONEMOTO ont étudié la libération de $14CO_2$ à partir de glucose marqué. Celle-ci est considérablement augmentée en présence de BM.

Les travaux de MYRON BRIN (16) ont montré que 95 % de la radioactivité retrouvée au niveau du CO_2 provenait des deux premiers carbones du glucose, avec un rapport d'oxydation deux fois plus grands en moyenne, pour le carbone n° 1 du glucose (Fig. De plus, le carbone 6 n'est jamais oxydé. La comparaison de ce rapport en présence et en l'absence de BM, montre l'augmentation de l'oxydation du carbone 1, mais une augmentation relativement plus importante de celle du carbone 2.

Ces faits indiquent qu'en présence du colorant, il existe une dérivation importante du glucose-6-phosphate vers la voie des pentoses, celle-ci pouvant fonctionner en véritable cycle avec remontée de la voie des trioses, l'oxydation ne concernant que la moitié supérieure de la molécule de glucose. De plus, l'étude de la radioactivité au niveau du lactate formé, indique en l'absence de BM, l'utilisation de 10 % du glucose par la voie des pentoses et de 60 % en présence du colorant.

Enfin, la mesure du quotient respiratoire a été faite après un temps d'incubation de 3 heures (16). On devrait s'attendre, théoriquement, en présence d'une utilisation glucidique exclusive, à trouver une valeur égale à 1. En fait, MYRON BRIN (16), trouve un quotient compris entre 0,79 et 0,86.

Nous retrouverons ces données lorsque nous critiquerons les mesures que nous avons réalisées. Quoi qu'il en soit, il semble exister un surcroît de production d'O_2 relativement à celui du CO_2. Il est possible qu'une oxydation se produise au niveau de la voie des trioses, car en présence de BM, la consommation de glucose augmente en moyenne de 15 %, alors que le taux de lactate formé demeure, selon les auteurs, constant ou diminué de 20 %. Dès lors, il pourrait y avoir oxydation du $NADH_2$ produit au niveau de la 3-phospho-glycéraldéhyde déshydrogénase. Le dosage des métabolites intermédiaires en présence de BM semble aboutir à la même conclusion (174).

3 – PLACE DU BM PARMI LES AUTRES SUBSTANCES STIMULANT LA VOIE DES PENTOSES

Nous avons déjà signalé que le BM occupait la première place. Toutes ces substances sont réputées avoir un effet hémolytique chez le sujet déficient en G6PD ; nous aborderons donc cette liste lorsque nous parlerons de cette enzymopénie (Fig. 26). Ces substances n'ont aucune analogie structurale, elles se groupent sous le même caractère d'oxydant mais les modalités de la stimulation de la voie d'HOREKER sont sans nul doute très variables, et l'on possède peu de données sur ce sujet.

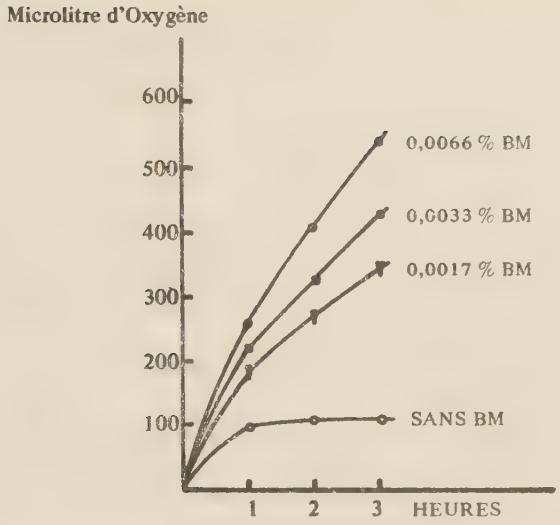


FIGURE 17 : Consommation en O_2 d'érythrocytes humains incubés avec différentes concentrations de BM. La courbe du bas représente la consommation en l'absence du colorant.

(D'après M. BRIN 16)

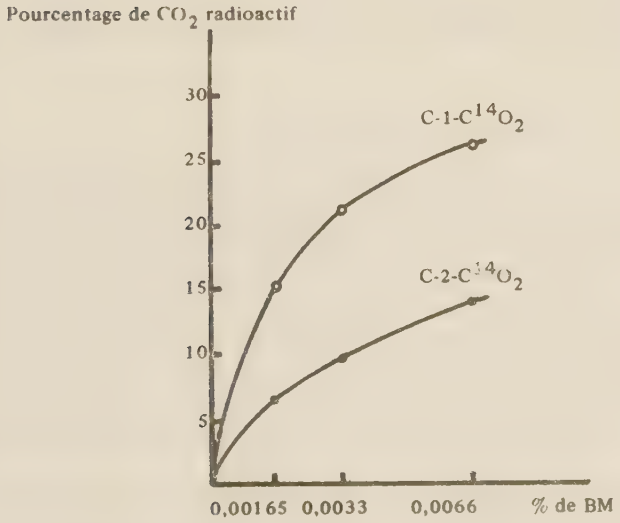


FIGURE 18 : Effet de la concentration en BM sur le pourcentage de radioactivité retrouvé au niveau du CO_2 à partir de C^{14}-1-glucose et C^{14}-2-glucose (D'après M. BRIN 1961)

Ainsi, en présence de primaquine ou d'α naphtol, la consommation en glucose de l'érythrocyte n'est pas modifiée mais le taux de lactate formé est diminué, respectivement de moitié et du cinquième (139).

Le problème se pose du rapport exact des deux chaînes de la glycolyse, vis à vis de la production de pyridines nucléotides réduits. On ne possède que quelques faits épars concernant les couplages.

La vitamine C est capable de produire de l'eau oxygénée au niveau de l'érythrocyte : celle-ci pourra être détruite notamment sous l'influence de la glutathion péroxydase qui suppose une alimentation continue en glutathion réduit, régénéré grâce à la production accrue de $NADPH_2$ (Fig. 6).

Il revient toutefois à SASS (21), d'avoir précisé le rôle de la NADPH méthémoglobine réductase dans ces phénomènes.

Cet auteur a étudié comparativement la stimulation du shunt des pentoses en présence de différentes substances chez trois catégories de sujets, normaux, déficients en G6PD et enfin dans un cas de déficit en NADPH méthémoglobine réductase (21).

Nous reproduisons le tableau de ces résultats (Fig. 19).

Nous voyons que les différents oxydants ne donnent pas une réponse uniforme. Ainsi, la primaquine stimule plus fortement la voie des pentoses lorsque la NADPH diaphorase est absente, alors qu'à l'opposé, le BM et le bleu de crésyl brillant sont affectés dans la capacité d'élever le niveau de la glycolyse oxydative en l'absence de cette enzyme.

Nous avons déjà mentionné que la stimulation de la voie de Dickens était en corrélation avec la concentration de BM dans le milieu (Fig. 17). A la lumière de ces deux derniers faits, il devient évident qu'il faille envisager le problème de la perméabilité du globule rouge au bleu de méthylène : ces phénomènes impliquant une activité métabolique sous-jacente.

2 – PERMEABILITE DU GLOBULE ROUGE VIS A VIS DU BM –

Pendant longtemps, on a cru que l'érythrocyte réduisait le BM et que le leuco-dérivé formé demeurait extra-cellulaire ; ceci est inexact. Par la suite, l'importance de l'interférence du colorant dans la réduction de la méthémoglobine s'est imposée et l'on doit à BEUTLER et à KAPLAN (51, 53), d'avoir relevé la possibilité d'une diffusion extra-cellulaire du leuco-bleu accumulé par l'érythrocyte, ce phénomène pouvant aboutir à la réduction de la méthémoglobine soit en solution dans le milieu extra-cellulaire, soit au niveau d'autres globules rouges déficients en enzymes indispensables.

En 1965 OSKI constatait, sur l'étalement d'érythrocytes ayant incubés avec du BM, que 10 % étaient plus foncés, ce phénomène disparaissant chez le sujet déficient en G6PD (152).

Enfin, SASS & Coll. depuis 1966 ont étudié principalement ces phénomènes de perméabilité. Nous allons en détailler les principales données qui ont servi de base au présent travail (18, 19, 20, 21, 106, 107, 175).

En 1966, SASS propose un test de dépistage rapide du déficit en G6PD. Le principe est le suivant : l'érythrocyte qui possède une voie des pentoses intacte, accumule

Composé Ajouté	Concentration finale (mM)	Micromole de $^{14}CO_2$ formé / ml cellules		
		Erythrocyte normal	Déficient en G-6-PD °	Déficient en $NADPH_2$-Diaphorase
Aucun	-	0,21	0, 1	0, 37
Primaquine diphosphate	2, 00	0, 65	0, 27	1, 10
Acétyl phenyl hydrazine	9, 90	1. 10	0, 30	1, 40
Naphtol	2, 10	2, 00	0, 40	2, 70
Acide Ascorbique	8, 40	0, 81	0, 33	0, 96
Ac. Déhydro Ascorbique	8, 40	2, 82	0, 82	2, 60
Ferricyanure de K	80, 00	0, 42	0, 31	0, 86
Bleu de méthylène	0, 056	5, 20	0, 87	1, 40
Bleu de crésyl brillant	0, 056	6, 10	0, 98	0, 92
Dichloro phénol indophénol	0, 056	0, 72	0, 21	0, [illegible]
Cystéine	6, 90	1, 06	0, 34	1, 38

° Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase.

FIGURE 19 : Effets de différentes substances sur l'activité du shunt des pentoses phosphates au niveau de globules rouges normaux et enzymopéniques. (D'apres SASS (21))

et réduit le BM, à condition que du glucose soit présent dans le milieu (Fig. 20). Le lactate n'est pas un substrat très adéquat (Fig. 21). Après incubation, le milieu extracellulaire est dépourvu de colorant et les spectres réalisés sur des suspensions globulaires montrent la transformation du BM en leuco-dérivé.

Le maintien du BM réduit dans l'érythrocyte est soumis à deux ordres d'influences oxydantes et réductrices. La méthémoglobinisation par les nitrites gêne la pénétration du BM (Fig. 22).

A l'état normal, le BM est expulsé au dehors de la cellule si on élimine le glucose du milieu par lavage. En l'absence de glucose, l'érythrocyte peut conserver le colorant à condition de réaliser l'incubation en anaérobiose.

Enfin, l'étude de quelques inhibiteurs courants, montre un blocage de la pénétration du BM en présence de monoiode-acétate, et une indifférence à la présence de fluorure (Fig. 21).

Au total, la fourniture en substrat de la voie des pentoses ainsi que l'intégrité de cette dernière, est nécessaire à la pénétration du BM. Le colorant alors réduit, se trouverait sous une forme moins diffusible selon SASS et ce *«reductive-trapping»*, serait soumis à la double influence, réductrice de la voie des pentoses et oxydante de l'oxygène.

L'action des inhibiteurs donne à penser qu'une fonction SH est essentielle mais que la voie des trioses en aval de l'énolase, n'est pas nécessaire. Toutefois, nous notons qu'il n'est pas certain que le leuco-bleu soit moins diffusible car l'érythrocyte qui a accumulé ce colorant est capable de réduire rapidement une solution de méthémoglobine (51, 53). L'état du leuco BM dans l'érythrocyte demeure encore une question sans réponse. L'application de son test aux dépistages, sur de grandes séries, a permis à SASS de montrer l'absence d'accumulation dans le déficit en G6PD (20) et dans un rare cas de déficit en NADPH diophorase (21).

En résumé, l'étude du métabolisme redox de l'érythrocyte en présence de BM nous montre l'existence d'une chaîne de transport comportant, à son origine, une fonction en pyridines nucléotides réduits mais possédant deux types d'accepteur terminal selon les circonstances, l'oxygène ou la méthémoglobine. Nous avons vu qu'à ces faits métaboliques s'ajoutaient des phénomènes contingents de perméabilité au bleu de méthylène. Dès lors, avec le test au bleu de méthylène de SASS apparaît un moyen nouveau d'étude et de dépistage très simple de certaines enzymopénies héréditaires pouvant affecter le métabolisme redox de l'érythrocyte.

Nous allons donc donner la place du test de SASS parmi les autres techniques de dépistage rapide actuellement pratiquées. Nous aborderons ensuite, de manière succinte, les différents chapitres de la pathologie du métabolisme redox de l'érythrocyte humain.

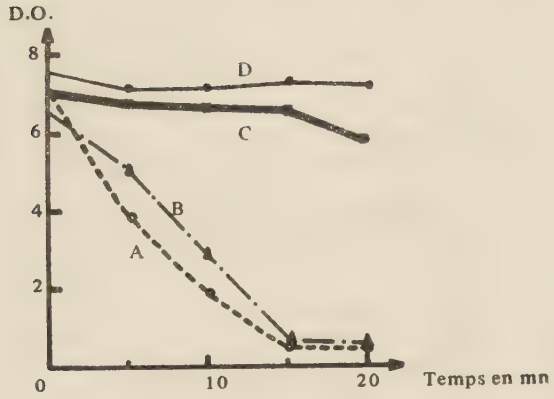


FIGURE 20 – Accumulation de BM par l'érythrocyte, appréciée en mesurant la DO du surnageant à 615 mμ en fonction du temps : A et B érythrocytes de sujets normaux ; C représente un sujet déficient en G6PD et D un sujet normal dont les érythrocytes après lavages sont incubés sans glucose. (d'après SASS).

– o –

Le protocole suivi par SASS est le suivant :

REACTIFS :

- Solution salée à 0,9 g % de NaCl et glucosée à 200 mg %.
- Solution de travail de BM préparée par dilution au 1/50 avec la solution précédente, d'une solution stock de bleu à 300 mg % en eau distillée.

INCUBATION :

Un tube reçoit : 5 ml de solution salée - glucosée , 0,5 ml de solution de travail de BM et 1 ml de sang total.

L'incubation est réalisée à température ambiante et on lit la D.O. du surnageant après 20 mn à 615 mμ.

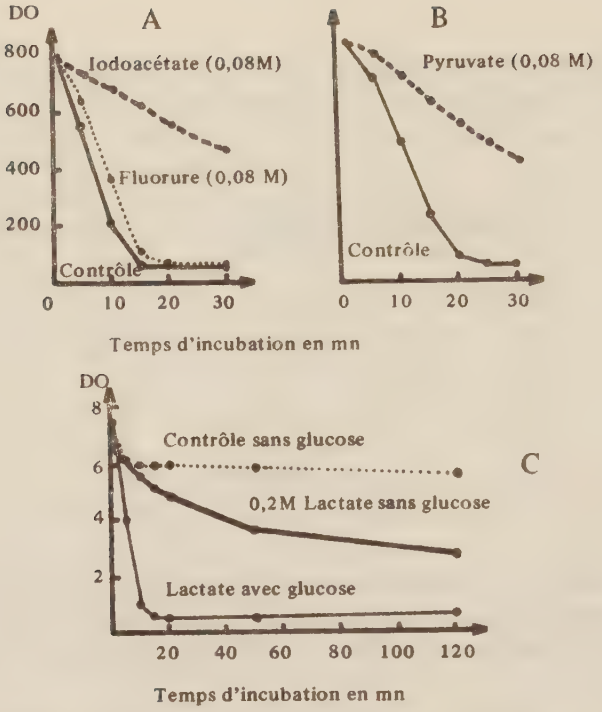


FIGURE 21 – ROLE DE LA PRODUCTION DE $NADH_2$ DANS L'ACCUMULATION DU COLORANT. A : EFFET DE L'IDIOACÉTATE ET DU FLUORURE - SUPPLÉANCE MÉTABOLIQUE PARTIELLE PAR LE PYRUVATE (B) ET PAR LE LACTATE (C). D'après SASS).

FIGURE 22 – ACCUMULATION DE BM PAR L'ERYTHROCYTE NORMAL (b et c) ET METHEMOBLOBINISÉ (D'après SASS).

CHAPITRE QUATRIEME

EXPLORATION DU METABOLISME REDOX DE L'ERYTHROCYTE

Les méthodes d'exploration peuvent se classer en deux groupes : l'un comprenant des tests d'orientation dont le résultat renseigne sur l'état fonctionnel d'une chaîne métabolique, et l'autre, dans lequel chaque enzyme est dosée séparemment, aboutissant à une appréciation quantitative plus ou moins fine selon la technique utilisée.

Ces deux étapes sont complémentaires, la première ayant l'avantage de s'adresser à des érythrocytes entiers.

Le déficit une fois établi, amène à préciser deux ordres de problèmes : la nature qualitative et quantitative de l'anomalie moléculaire d'une part, et d'autre part l'étude de ses conséquences métaboliques.

1 – LES TESTS D'ORIENTATION PRATIQUES SUR L'ERYTHROCYTE INTACT –

Notre propos sera moins de faire l'historique de ceux-ci, que d'envisager les méthodes les plus fréquemment utilisées.

1 – TEST DE BREWER OU EPREUVE DE REVERSION DE LA METHEMOGLOBINE (161)

On peut explorer directement les voies de réduction de la méthémoglobine et indirectement la formation des co-enzymes réduits. Cette épreuve consiste à méthémoglobiniser totalement l'érythrocyte par le nitrite de soude, oxydant doux, franchissant aisément la membrane. Les globules sont ensuite lavés pour éliminer toutes traces de nitrite, puis incubés à 37° en présence d'un substrat approprié : glucose, ou inosine, dans tous les cas avec et sans BM.

Des prélèvements sont réalisés à des temps successifs et le taux de méthémoglobine résiduelle est apprécié selon une méthode classique (70).

Nous avons déjà envisagé les séquences enzymatiques explorées dans ces conditions et nous n'y reviendrons pas. Les figures 23 et 24 nous montrent les résultats obtenus dans le déficit en G6PD.

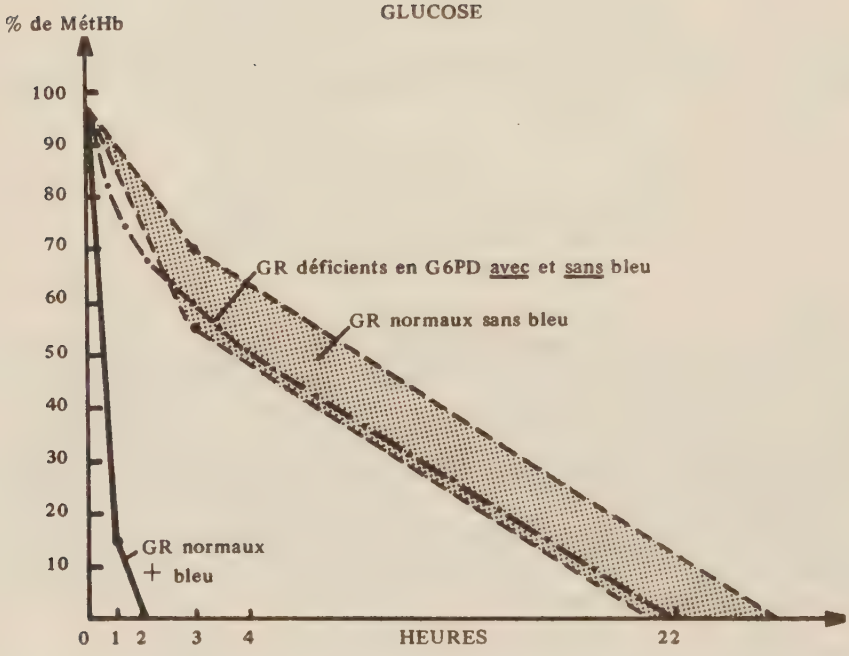


FIGURE 23 – TEST DE BREWER SUR DES ERYTHROCYTES DEFICIENTS EN G6PD.

Le comportement des érythrocytes déficients est identique à ceux d'un sujet normal en l'absence de BM, la réduction ne pouvant faire intervenir que la voie des trioses et la $NADH_2$ diaphorase. (D'après KAPLAN).

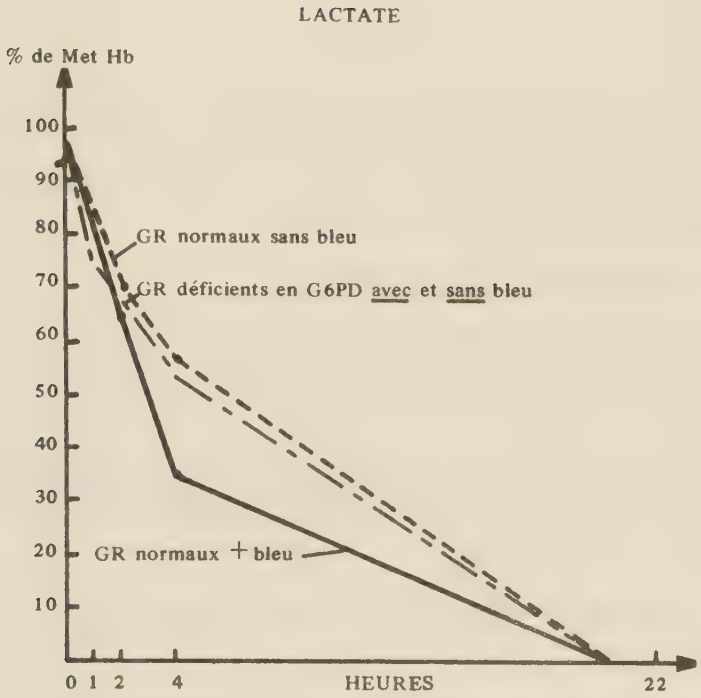


FIGURE 24 – La réduction de la méthémoglobine en présence de lactate montre chez le sujet déficient en G6PD l'absence de stimulation par le BM, sans que ce fait puisse être clairement expliqué. (D'après KAPLAN).

2 – L'EPREUVE DE LA GLUTATHION PEROXYDASE D'APRES MILLS ET RANDALL (162)

Les globules rouges sont incubés avec de l'acide ascorbique qui, en présence d'oxyhémoglobine s'oxydent lentement en formant de l'eau oxygénée. Après avoir bloqué le catalase par l'azoture de sodium, on étudie soit la protection de l'hémoglobine contre la dégradation oxydative (formation notamment de choléglobine), soit la chute du glutathion réduit.

Nous avons représenté Figure 6, la chaîne métabolique nécessaire à la lutte contre cette oxydation.

La figure 25 montre les résultats de cette épreuve dans deux circonstances : l'une normale dans laquelle le taux de glutathion réduit arrive à se maintenir un certain temps grâce à l'activité de la glutathion réductase et de la G6PD, l'autre, où l'on assiste à un effondrement dès le départ, en l'absence de glucose (ou en présence de substrat chez un sujet déficient en G6PD par exemple).

3 – PHOTOMETRIE AU BLEU DE METHYLENE

Nous avons déjà signalé une micro-méthode développée par OSKI (152) et le test de SASS (20). Ce dernier permet le dépistage de déficit en G6PD et en $NADPH_2$ diaphorase avec des moyens très simples et très rapidement mis en oeuvre.

4 – LE DEPISTAGE D'UN DEFICIT EN CATALASE fait intervenir de nombreuses méthodes toutes mettant l'érythrocyte en présence d'un système extra-cellulaire générateur d'eau oxygénée. On suit l'évolution du taux de méthémoglobine, celui-ci s'élevant rapidement dans l'acatalasémie (100).

2 – LES DOSAGES PARTICULIERS AU NIVEAU DE L'HEMOLYSAT –

1 – LE GLUTATHION REDUIT

Le dosage de ce métabolite a été grandement facilité par la mise en oeuvre d'une méthode simple et spécifique utilisant l'acide 5-5'dithio-bis-nitrobenzoïque (163). Le niveau de glutathion réduit ne reflète pas obligatoirement l'état des sytèmes impliqués dans sa réduction.

La méthode la plus anciennement connue et la plus utilisée à été décrite par BEUTLER et consiste à suivre la stabilité du taux de glutathion réduit au niveau d'érythrocytes soumis à l'action d'oxydants (acétyl phényl hydrazine) (164).

2 – LES DOSAGES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Ils sont en général simple et reposent sur l'existence d'un pic d'absorption à 340 mμ spécifique de l'état réduit des pyridines nucléotides. Différentes méthodes visant à étudier dans le domaine du spectre visible, la production, en particulier de $NADPH_2$, ont été développées dans le but d'un dépistage rapide du déficit en G6PD : méthode de décoloration du bleu de crésyl brillant ou test de MOTULSKY (165), formation d'un formazan à partir du MTT* (166) ou bien l'étude de la fluorescence des pyridines nucléotides (167).

** Bromure de (diméthyl-4,5 thiazolyl - 1,2) - 3 - diphényl-2,3-tétrazolium).*

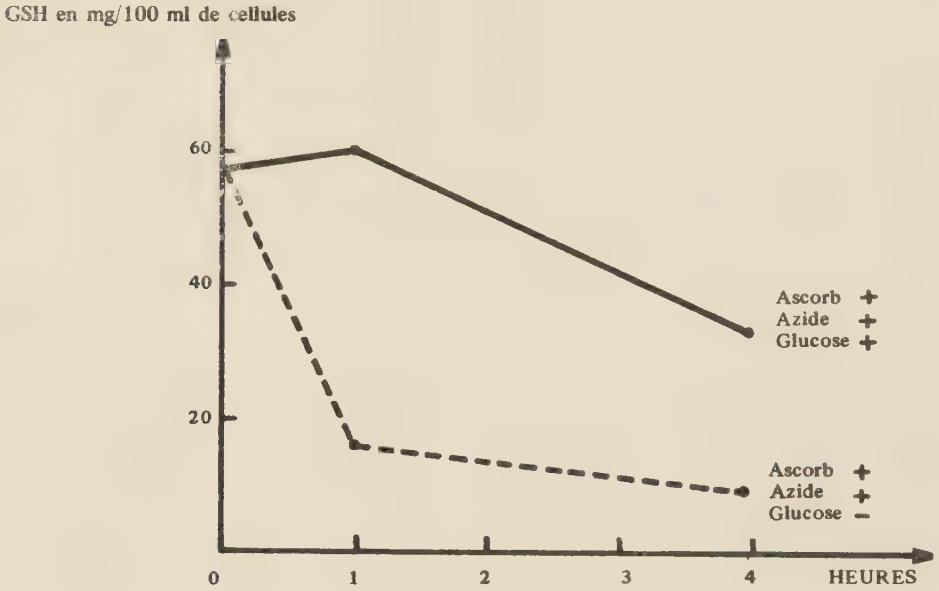


FIGURE 25 – Epreuve de la glutathion peroxydase, d'après MILLS et RANDALL (89) – Milieu d'incubation : suspension globulaire à 3 % dans du sérum physiologique tamponné pH 7,4, contenant acide ascorbique : 10^{-3} M ; azoture de sodium : $5,10^{-3}$ M ; glucose : $1,6 . 10^{-3}$ M ; température 37°.

Enfin, nous avons décrit lors de l'étude des diaphorases, les différents types d'accepteurs pouvant être susceptibles de servir à des fins de dosages : le dichlorophénol indophénol étant de loin le plus utilisé.

CHAPITRE CINQUIEME

ANOMALIES HEREDITAIRES DES SYSTEMES D'OXYDO–REDUCTION

Parmi les enzymopathies érythrocytaires congénitales individualisées à l'heure actuelle avec certitude, 7 concernent des systèmes enzymatiques intervenant dans des processus d'oxydo-réduction.

On peut les classer en :

– Anomalies de production du $NADPH_2$: déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase, déficit en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase ;

– Anomalies de réduction de la méthémoglobine : déficit en diaphorases ;

– Anomalies portant sur le glutathion : déficit en glutathion réductase, déficit en glutathion synthétase ;

– Anomalies des systèmes peroxydasiques déficit en glutathion peroxydase, acatalasém

1 – ANOMALIES DE PRODUCTION DU $NADPH_2$

1 – DEFICIT EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE (G6PD)

Découverte il y a une douzaine d'années chez les sujets intolérants à la primaquine, cette enzymopathie héréditaire a rapidement suscité un intérêt considérable de la part des hématologistes, des pharmacologistes, des biochimistes et des généticiens.

Ce déficit intéresse plus de 100 millions d'individus dans le monde et environ une quarantaine de variétés moléculaires de G6PD humaine ont été décrites. Une mutation enzymatique lorsqu'elle se produit, affecte tous les tissus et on a montré que cette protéine était spécifiée par le chromosome X. Dans la dernière partie de ce travail nous examinerons en détail le déficit en G6PD et les variantes de ce caractère "véritable marqueur génétique" dans les populations mondiales. Dès à présent avec MOTULSKY, on peut dire qu'il existe grossièrement quatre types de mutants (100) :

– 1) Un groupe de sujets associant, à une instabilité marquée de la G6PD, une anémie hémolytique chronique dont le mécanisme est inconnu.

Primaquine	Fèves
Pamaquine	Sulfoxone
Pentaquine	Acide p-aminosalicylique
Sulfanilamide	Antipyrine
Sulfapyridine	Probenecid
Sulfisoxazole	Acétanilide
Sulfacétamide	Phénylhydrazine
Sulfaméthoxypyridazine	Acétophénétidine
Salicylazosulfapyridine	Pyramidon
Naphtalène	Infections respiratoires virales
Bleu de méthylène	Hépatites virales
Vitamine K ?	Mononucléose infectieuse
Acide acétylsalicylique	Pneumonie; Septicémies et Typhoïde

FIGURE 26 : Principaux agents provoquant une anémie hémolytique chez les sujets déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase. (D'après KAPLAN)

– 2) Une anémie hémolytique provoquée par des agents «toxiques» (drogues ou fèves, voir fig. 26). Ces substances ne provoquent des accidents que chez les sujets déficients et l'on peut distinguer deux exemples cardinaux : le type A négroïde et le type B méditerranéen.

- Dans le type A Négroïde

Le taux de G6PD dans les cellules jeunes est normal : la tare est représentée par une accélération du déclin de l'enzyme. L'hémolyse est provoquée par l'ingestion de médicaments du type primaquine (voir fig. 26).

- Dans le type B Méditerranéen

Les cellules jeunes ont aussi un défaut en enzyme. Dans ce cadre rentre le favisme où l'hémolyse est provoquée par l'ingestion de fèves. Ce type d'hémolyse n'existe pas chez le sujet noir porteur de la variante A.

Enfin, on ignore pourquoi certains sujets déficients du type méditerranéen peuvent ingérer impunément des fèves.

– 3) Ce groupe correspond à des mutants ayant un taux d'enzyme normal. Les toxiques sont sans effets. L'exemple le plus courant est le type A^+ négroïde qui est une variété électrophorétique plus rapide que le type B^+ habituellement rencontré chez le blanc. La différence entre ces deux formes provient du remplacement d'une asparagine par l'acide aspartique.

– 4) Enfin, on a décrit quelques mutants qui à une anomalie structurale, associent une activité plus élevée.

De plus, le déficit en G6PD trouve une expression variable selon le sexe chez l'hétérozygote.

Le sujet mâle a un niveau d'enzyme diminué. La femme hétérozygote obligatoire a un niveau d'activité situé dans un large intervalle : 30 à 40 % ont un taux normal et 70 % ont un niveau intermédiaire. Ces phénomènes ont été expliqués selon le schéma proposé par LYON (Fig. 27), par une inactivation durant l'embryogénèse de l'un ou l'autre des chromosomes X. Il en résulte une double population cellulaire, l'une normale, l'autre tarée, la proportion de chacune déterminant le niveau d'activité globale chez l'hétérozygote. La vérification de ces hypothèses a permis de montrer que la G6PD pouvait être utilisée comme marqueur génétique. On a pu montrer que l'origine de certaines tumeurs (leiomyome, lymphome, ...), se faisait en réalisant un clone cellulaire unique à l'opposé d'autres tumeurs (néoplasies du sein ou du colon) où l'on retrouve l'expression des deux chromosomes X en accord avec l'origine multi-cellulaire de ces néoformations.

Quoi qu'il en soit, la conséquence immédiate du déficit en G6PD est l'impossibilité plus ou moins totale pour l'érythrocyte, de produire du NADP réduit. Il s'en suit une baisse du glutathion réduit et une instabilité de ce dernier en présence d'une agression oxydative.

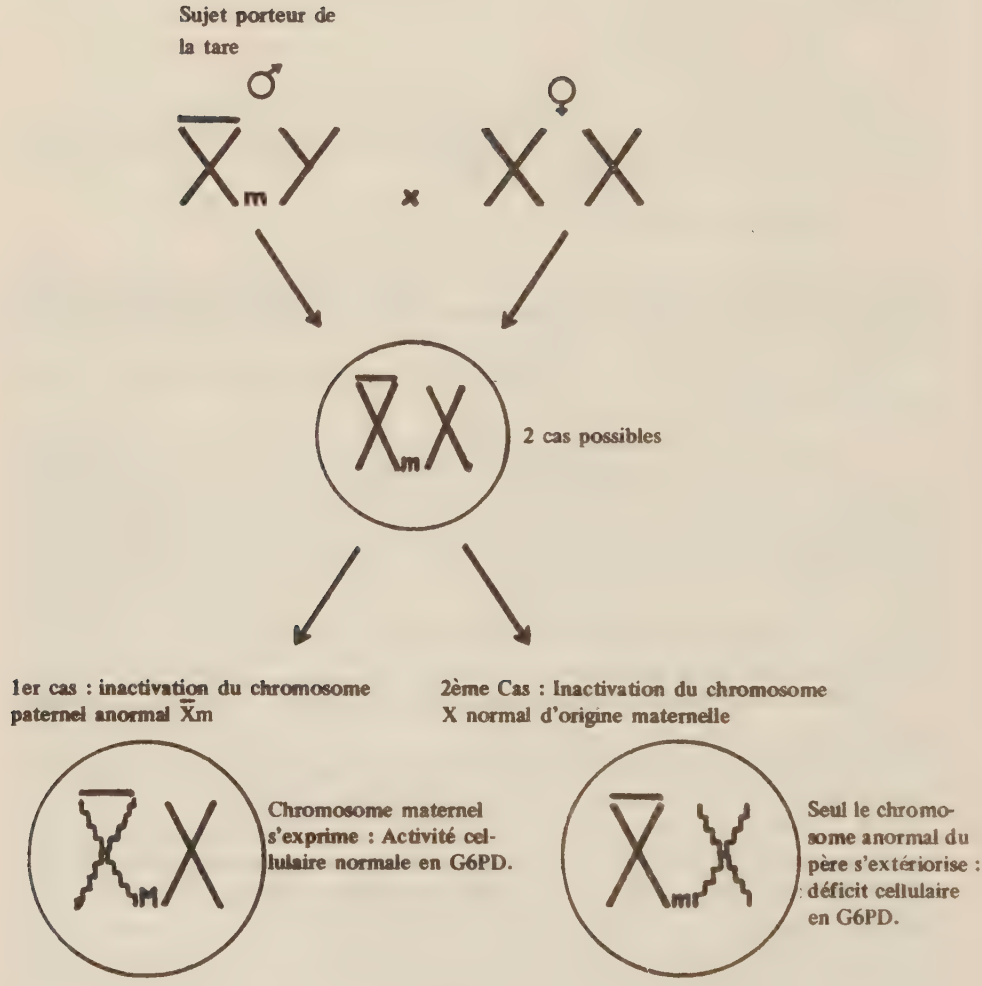


FIGURE 27 – Résumé de l'hypothèse selon M. LYON de l'inactivation partielle d'un chromosome X chez l'hétérozygote femelle.

Dans sa forme habituelle, le déficit n'entraîne un syndrome hémolytique que sous l'effet de certains médicaments ou toxique (Fig. 26). La physio-pathologie de cette hémolyse est encore mal connue. Outre l'effondrement du glutathion réduit, il se produit une élévation transitoire du glutathion oxydé, une méthémoglobinisation partielle, une dénaturation oxydative de l'hémoglobine aboutissant à la formation des corps de HEINZ et peut-être une attaque des groupements SH réactifs de la cellule.

Toutefois, la séquence exacte des évènements oxydatifs est très controversée

2 – LE DEFICIT EN 6-PHOSPHO-GLUCONATE-DESHYDROGENASE

On en connaît deux cas (168, 169), pour lesquels le niveau enzymatique était diminué de moitié et ne s'accompagnait d'aucune manifestation hématologique. Il est intéressant de noter que la réduction de la méthémoglobine en présence de BM, et le test de stabilité du glutathion réduit était normal.

2 – ANOMALIES DE REDUCTION DE LA METHEMOGLOBINE –

L'existence d'une méthémoglobinémie chez un sujet, implique, du point de vue étio-pathogénique, trois mécanismes possibles :

– 1er cas : l'érythrocyte, dont les systèmes réducteurs sont normaux, est soumis à une agression oxydante, toxique, médicamenteuse, professionnelle qui dépasse ses capacités réductrices.

– 2ème cas : ou bien, il existe un déficit en diaphorase, aboutissant à un déséquilibre intra-globulaire, qui penche en faveur de l'oxydation du pigment.

– 3ème cas : représenté par une anomalie moléculaire de l'hémoglobine plus sensible à l'oxydation spontanée et aboutissant à la formation d'une méthémoglobine anormale plus difficile à réduire.

Le point commun de ces hémoglobinoses, est une substitution d'acide aminé situé sur le commencement de l'hélice G de la globine (35).

Enfin, remarquons qu'il existe des cas mixtes : ainsi le nouveau-né qui, à l'état normal, présente un léger déficit en $NADH_2$ diaphorase: Il sera dès lors plus sensible à certaines agressions oxydantes médicamenteuses ou bactériennes.

1 – LE DEFICIT EN DPNH DIAPHORASE

On en connaît environ 250 cas et il représente la seule enzymopénie capable de provoquer une méthémoglobinémie notable. La tare serait transmise selon un mode autosomal récessif et très largement distribuée dans le monde avec une prévalence chez les indiens et les esquimaux d'Alaska.

Le sujet homozygote présente une méthémoglobinémie qui va de 20 à 50 %. Le sujet hétérozygote n'est généralement pas méthémoglobinémique dans les conditions normales : une suppléance pouvant être assurée par le glutathion réduit et la vitamine C circulante (et accessoirement par la $NADPH_2$ diaphorase). La figure 28 nous montre les résultats de l'exploration de la réduction de la méthémoglobine chez ces sujets.

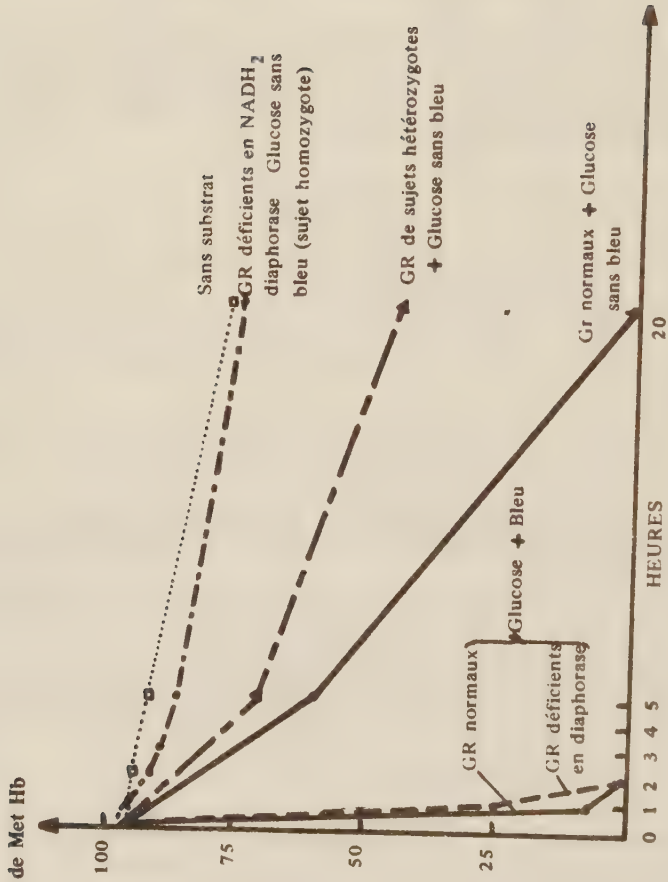


FIGURE 28 – Epreuve de réversion de la méthémoglobine dans les globules rouges de sujets déficients en $NADH_2$ diaphorase (homozygote et hétérozygote). (D'après KAPLAN).

Cliniquement, le malade présente une cyanose dès que le taux de pigment oxydé dépasse 10 %, éventuellement une dyspnée d'effort et quelques céphalées. Le problème se pose de définir les rapports exacts entre ce déficit et certaines formes de l'enfant avec un retard mental sévère.

Le traitement simple réclame l'administration de vitamine C ou de bleu de méthylène qui dans ce dernier cas assure une suppléance très rapide et spectaculaire selon un mécanisme que nous avons déjà envisagé.

2 – LE DEFICIT EN NADPH$_2$ DIAPHORASE

Un seul cas a été décrit par SASS et ne s'accompagne d'aucune anomalie hématologique (en particulier pas de méthémoglobinémie). Les globules rouges de ces sujets sont incapables de réduire correctement la méthémoglobine en présence de bleu de méthylène. En l'absence de BM la réduction est normale. (107)

3 – ANOMALIES PORTANT SUR LE GLUTATHION –

Il s'agit d'un groupe d'affections ayant en commun un tableau d'anémie hémolytique congénitale, non micro-sphérocytaire, une sensibilité particulière à certains médicaments ou toxiques, et un effondrement plus ou moins important du taux de glutathion réduit.

1 – LE DEFICIT EN GLUTATHION REDUCTASE

Dont il semble exister probablement différents types. Le tableau hématologique est très variable et il peut s'y associer des désordres neurologiques.

2 – LE DEFICIT EN GLUTATHION SYNTHETASE

Il amène à une privation en glutathion réduit, qui a été trouvé abaissé à 10 % de la valeur normale chez le sujet homozygote. La tare est recessive et autosomique.

4 – ANOMALIES DES SYSTEMES PEROXYDASIQUES –

1 - Le déficit en Catalase. La tare n'atteint pas seulement l'erythrocyte, mais aussi d'autres tissus. Elle n'entraine aucun désordre hématologique. Il semble exister dans ce cas une large suppléance par la voie des pentoses qui n'est pas sans rappeler l'hyperactivité de ce cycle chez certaines espèces animales (canard) dépourvues de cette enzyme à l'état normal.

2 - Le déficit en glutathion peroxydase de découverte récente, se présente comme une mutation récessive affectant le catalyseur terminal de la chaine de detoxication de l'érythrocyte. Cette anomalie peut se traduire par une hémolyse intra vasculaire provoqué par certaines drogues ou médicaments. Seuls, quelques cas familiaux ont été décrits.

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les pages qui précèdent nous ont permis de mettre en place les différents éléments du métabolisme de l'érythrocyte et nous avons présenté les principales données et les problèmes posés lorsque l'on envisage celui-ci dans la perspective des oxydo-réductions.

Chemin faisant, nous avons inclus et regroupé dans ce cadre, les différentes études qui ont eu pour objet l'incidence métabolique du Bleu de Méthylène.

Nous pouvons donc aborder et discuter quelques résultats de notre expérimentation et nous commencerons par l'étude photométrique et micromanométrique des suspensions d'érythrocytes incubées avec le BM.

CHAPITRE PREMIER

GLOBULE ROUGE ET BLEU DE METHYLENE

1 – LA PERMEABILITE DE L'ERYTHROCYTE AU BM –

Nous avons tenté d'étudier la perméabilité de l'érythrocyte au BM en réalisant l'incubation avec le colorant selon le protocole proposé par SASS (cf. p. 40).

En fait, réalisé sous cette forme, on n'observe le plus souvent aucune pénétration du colorant –quelles que soient la concentration de glucose ou les marques de bleu de méthylène utilisées*, ou encore le mode de prélèvement du sang. Dans de rares cas et de manière imprévue, nous avons pu saisir une très faible pénétration sans qu'il ait été possible de dire ce qu'il y avait eu de changé.

En conservant les concentrations de sang et de BM utilisées par SASS, nous avons essayé de saisir les conditions optimales d'accumulation de BM par l'erythrocyte. Par ailleurs, les critères de perméabilité au colorant ont été appréciés ici par une méthode différente, en réalisant une étude cinétique de la suspension globulaire au pic d'absorption maximum du BM (à 660 mμ).

Nous allons brièvement exposer le principe et les résultats de ces cinétiques. Nous appliquerons alors ce moyen à l'étude des conditions optimales de perméabilité, ce qui nous permettra de définir un nouveau protocole. Puis, nous mentionnerons quelques résultats d'étude spectrale qui nous feront mieux saisir certains paramètres des cinétiques monochromatiques.

1 - MOYENS D'ETUDE.

L'érythrocyte accumule le BM et le transforme en leuco dérivé. La forme oxydée du colorant absorbe à 660 mμ et il a été possible de suivre à cette longueur d'onde, la cinétique de réduction sur le milieu d'incubation.

* *MATHESON et COLEMAN ; HOPKIN et WILLIAMS ; KUHLMAN R.A.L.*.

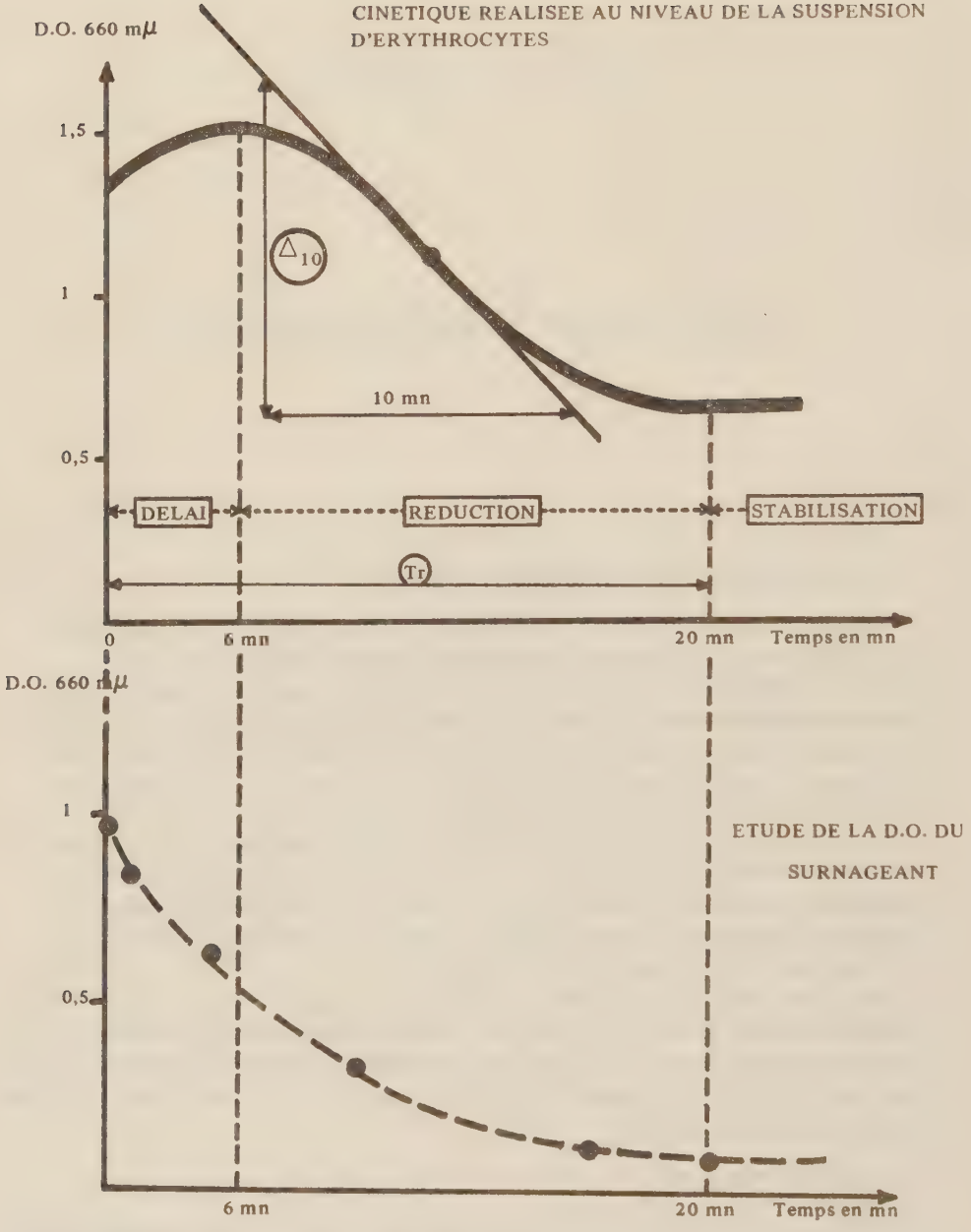

CINETIQUE REALISEE AU NIVEAU DE LA SUSPENSION D'ERYTHROCYTES
D.O. 660 mμ
1,5
1
0,5
Δ10
10 mn
DELAI
REDUCTION
STABILISATION
Tr
0
6 mn
20 mn
Temps en mn
D.O. 660 mμ
1
0,5
ETUDE DE LA D.O. DU SURNAGEANT
6 mn
20 mn
Temps en mn

FIGURE 29

Les enregistrements étaient réalisés sur un spectrophotomètre UNICAM SP 825 B à deux faisceaux. La cuve de dosage recevait l'incubat avec le colorant tandis que la cuve de référence contenait une suspension d'érythrocytes de même concentration, mais sans bleu. L'enregistrement se déroulait automatiquement et l'on suivait la chute de D.O. à 660 mμ, jusqu'à sa stabilisation finale.

Cette méthode permettait une appréciation très commode de la rapidité de pénétration. Nous avons représenté figure 29, les résultats généralement obtenus. On voit qu'un tel diagramme peut se décomposer en trois phases distinctes :

1 – *Une période de délai* –
durant laquelle la courbe est ascendante et se stabilise au bout de 6 mn environ, gagnant 0,10 à 0,30 unités de D.O. sur la D.O. initiale.

2 – *Phase d'accumulation et de réduction* –
On observe une chute de D.O. selon une courbe sigmoïde.

3 – *Une stabilisation finale* –
20 minutes environ après le début du test. A cet instant la D.O. est inférieure de 0,70 à 0,90 unités de la D.O. initiale.

Nous avons alors jugé la capacité du globule rouge à accumuler et réduire le colorant sur deux paramètres :

1) *Le temps de réduction* que nous noterons Tr.
Il représente le temps écoulé entre l'instant zéro et le moment où la D.O. est stabilisée. Nous avons pensé que cette stabilisation était acquise lorsque les variations de D.O. observées étaient de l'ordre de 0,01. Nous l'avons exprimée en minutes.

2) *Le* Δ_{10}.
Il représente la variation de D.O. en 10 mn, lue sur la tangente au point d'inflexion. Il peut représenter la vitesse maximum de réduction. Il est exprimé en unité de D.O.

Le sujet testé est d'autant plus actif que le Δ_{10} est élevé et conséquemment le Tr diminué.

C'est à l'aide de l'étude de ces deux paramètres que nous avons recherché les conditions optimales de l'incubation.

2 - LES CONDITIONS DE L'INCUBATION.

Elles sont simples et nous pouvons les résumer en trois points :

– Le type d'anti-coagulant utilisé est important : le recueil sur solution conservatrice ACD*, est préférable à l'héparine,

– Le milieu doit être tamponné à pH 8,00,

– En utilisant du sang total, l'addition de substrat est inutile.

* *Acide Citrique Dextrose*

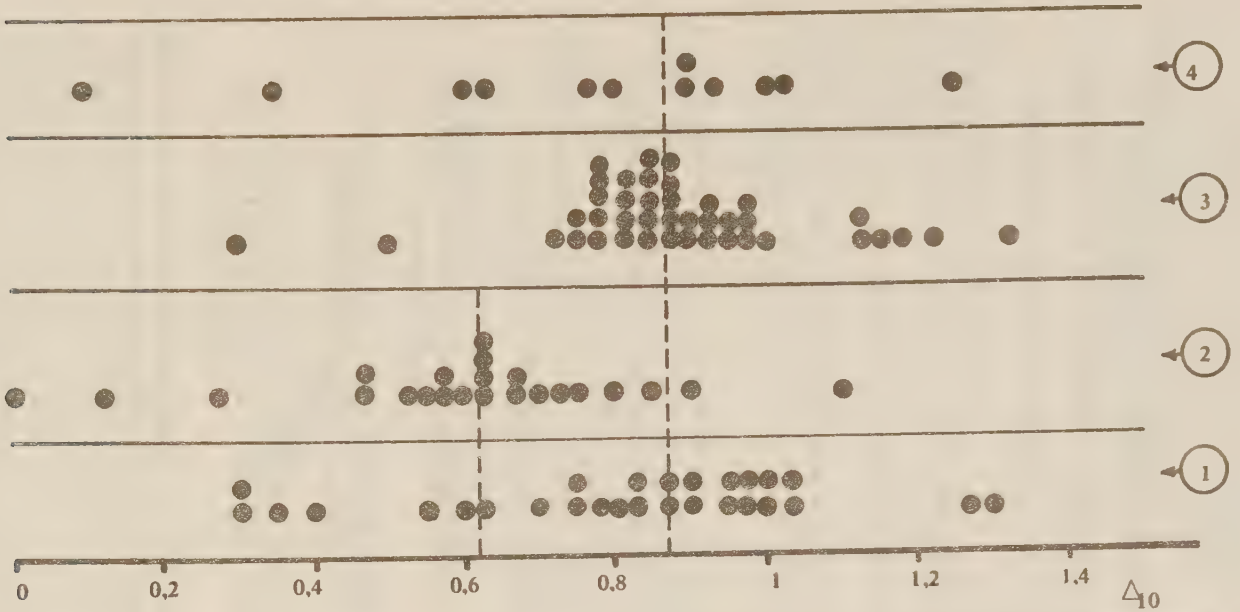


FIGURE 30 – L'activité de chaque sujet était appréciée selon le Δ_{10}, figuré en abscisse. Les incubations avec le BM ont été réalisées à partir de sang recueilli sur ACD et provenant de sujets donneurs sains. Le test, réalisé en tampon véronal, était appliqué dans différentes conditions :

1 : sur hématies lavées à 4° C (en l'absence de tout substrat)

2 : directement sur sang total, sans pré-agitation

3 : sur sang total après agitation du sang durant 5 minutes

4 : identique à 3, mais avec addition de glucose au milieu.

On constate que les sujets testés selon les conditions 1, 3 et 4 ont sensiblement le même Δ_{10} moyen. L'addition de glucose au milieu ne corrige pas l'hypoactivité de quelques sujets (conditions 4 par rapport à 1 et 3). Si l'on omet l'agitation du sang avant le test, on observe un Δ_{10} moyen plus faible (conditions 3 par rapport à 2).

Nous nous sommes limités à l'étude du sang prélevé sur milieu ACD. Nous envisagerons principalement le rôle de la concentration en ions H^+, le test sur hématies lavées, les conditions d'aérobiose, et l'effet de l'EDTA.

Le pH

Au pH physiologique de 7,40, la rentrée du BM n'est pas très bonne quel que soit le tampon utilisé (tampon TRIS-HCl ou phosphate en liquide de Ringer). Il existe un pH optimum voisin de 8,00. Celui-ci est assez étroit : en deçà de 7,40 et au delà de 8,50 l'érythrocyte perd 50 % de son activité, jugée sur le Δ_{10}. A pH 7,00, il n'y a plus d'accumulation. Lorsqu'on réalise un incubat selon la méthode de SASS (cf. p.40) le pH du milieu est aux environs de 6,50. Au total, nous avons retenu deux tampons dans nos incubations · TRIS - citrique pH 8,00 (0.075 M), ou Véronal pH 7.80 (0,01 M). Le tampon Borate ne convient pas.

Le lavage des hematies

Le test de SASS est réalisé à partir de sang total. Les résultats semblent meilleurs après lavage des hématies à l'aide de la solution tamponnée utilisée pour les incubats. Ce surcroît d'activité ne s'observe qu'à la condition de réaliser cette opération à 4°C, car à température ambiante se produit une inhibition presque totale. Le lavage dans des solutions salines à 9 ‰ de Nacl a le plus souvent un effet désastreux. Lorsque le test n'est pas réalisé immédiatement, les hématies doivent séjourner à 4°C à l'état de culot de centrifugation. La remise en suspension ne doit s'effectuer qu'au dernier moment, car dans le cas contraire on observerait une forte inhibition.

Les conditions d'aérobiose

Il semble que la rentrée du BM et partant sa réduction, soit nettement améliorée lorsque le globule rouge est saturé d'oxygène.

En effet, l'agitation discontinue des cuves durant la cinétique accélère la pénétration du bleu. On arrive à un résultat identique et plus commode en saturant le sang, par agitation manuelle avant le test durant 5 minutes. L'amélioration plus ou moins importante jugée sur le Δ_{10}, ne semble pas liée au Δ_{10} de départ (sans agitation).

L'étude de ces conditions se trouve résumée sur la figure 30, où nous avons choisi le Δ_{10} comme critère d'activité. On peut facilement voir que les Δ_{10} du test réalisé sur hématies lavées, sont sensiblement du même ordre que ceux du test réalisé sur sang total, agité au préalable. Nous avons pensé que le lavage pouvait agir par oxygénation (lors de la remise en suspension des culots de centrifugation) et nous l'avons abandonné pour simplifier en pratiquant le test sur sang total avec agitation préalable. Nous ajouterons que cette agitation peut avoir un effet bénéfique supplémentaire en détruisant les rouleaux d'hématies.

Rôle de l'EDTA et du plasma

Nous l'envisagerons en l'absence et en présence d'érythrocytes.

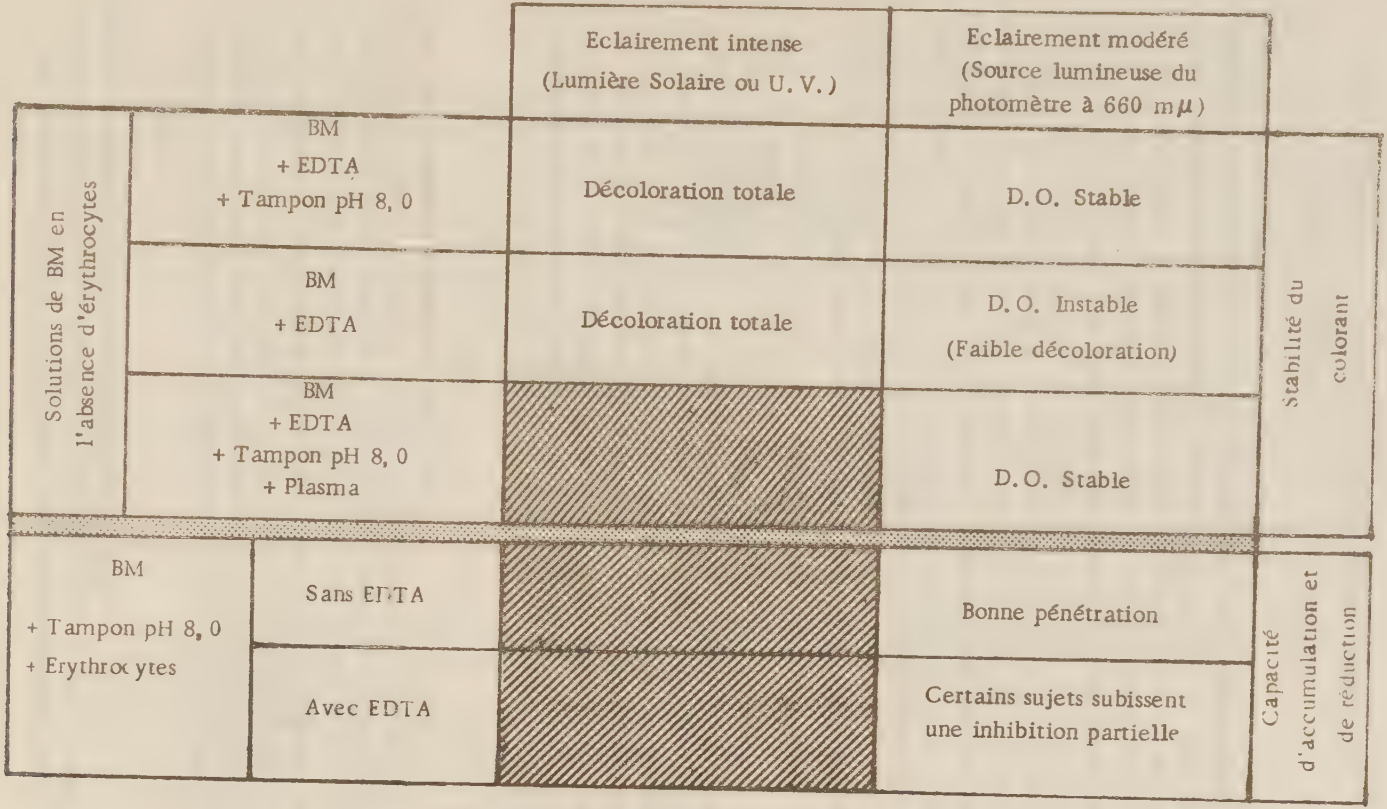


FIGURE 31 - Nous avons résumé l'influence de l'EDTA; de la lumière et du plasma sur la stabilité des solutions de BM. Nous avons ajouté au-dessous l'effet de l'EDTA sur la perméabilité des érythrocytes au colorant.

1) En l'absence d'érythrocytes :

Nous avons constaté que des solutions de BM, en présence d'EDTA, pouvaient être très facilement réduite sous l'influence d'un éclairement très intense (lumière solaire ou lampe à U.V. courts). Cette réduction photochimique est tout-à-fait réversible. On pouvait se demander si l'éclairement que subissaient les incubats lors des enregistrements au spectrophotomètre ne pouvait pas être gênant.

Nous avons constaté que les solutions de bleu, à la condition qu'elles soient tamponnées étaient stables : la D.O. enregistrée à 660 mμ gardait une valeur constante. Lorsque l'on répétait l'expérience en utilisant un milieu non tamponné, on observait une chute de D.O..

Enfin le plasma n'introduit aucun élément d'instabilité : le spectre du BM n'est pas modifié ce qui permet d'exclure une liaison du colorant avec les protéines plasmatiques. Nous avons résumé ces données au niveau de la figure 31.

2) En présence d'érythrocytes :

L'EDTA semble gêner modérément la pénétration du BM. Toutefois certains sujets semblent très sensibles à la présence de cette substance et présentent un retard marqué à la pénétration du colorant – cf. Figure 32. Néanmoins nous avons conservé l'EDTA dans nos incubations et nous discuterons plus loin le mécanisme de cette inhibition partielle.

3 - LE TEST AU BLEU DE METHYLENE.

Les données précédentes nous permettent d'énoncer le protocole que nous avons retenu pour réaliser ce test. Nous n'avons gardé du test de SASS, que la concentration de sang et de bleu.

Le test n'est pratiqué qu'à partir de sang total recueilli sur solution ACD ; le milieu doit être tamponné et il est inutile d'ajouter du glucose. Enfin le sang doit-être vigoureusement agité avant le test.

La pénétration du colorant dans l'érythrocyte est suivie de sa réduction. Il est possible de réaliser une cinétique de réduction sur la suspension d'érythrocytes en suivant l'évolution de la D.O. à 660 mμ.

Le protocole est le suivant :

I – Réactifs :

1) Solution stock de bleu de méthylène *.

Dissoudre : BM – 300 mg
eau distillée – qsp 100 cc
(stable 2 mois à 4°C)

2) Tampon TRIS-citrique 0,075 M ph 8,00.

Solution (a) : TRIS base ———————— 9,1 g
EDTA (0,04 M) ———————— 1,17 g
Solution NaCl à 9g %o – qsp 1000 cc.

** MATHESON and Coleman*

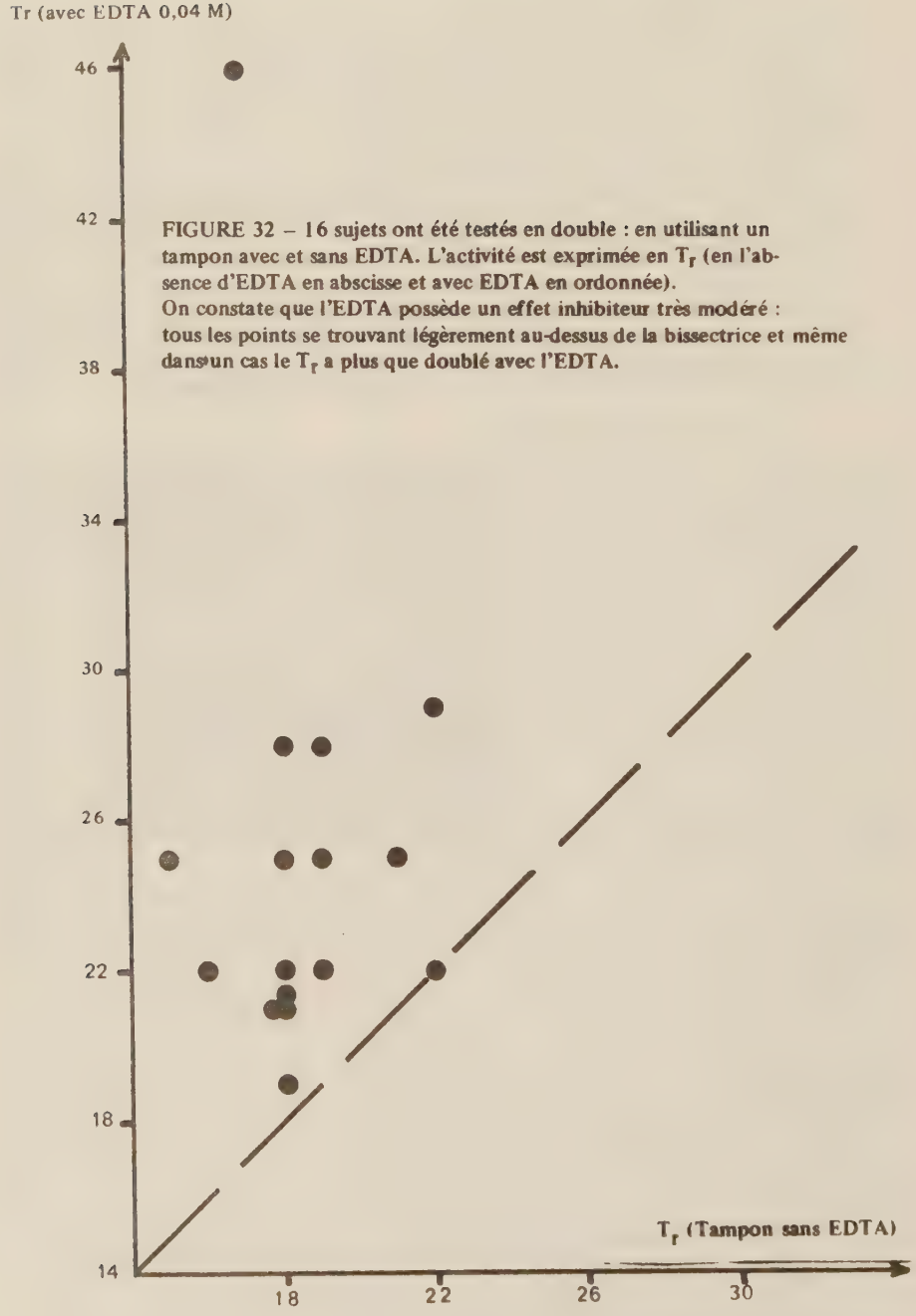


FIGURE 32 – 16 sujets ont été testés en double : en utilisant un tampon avec et sans EDTA. L'activité est exprimée en T_r (en l'absence d'EDTA en abscisse et avec EDTA en ordonnée).
On constate que l'EDTA possède un effet inhibiteur très modéré : tous les points se trouvant légèrement au-dessus de la bissectrice et même dans un cas le T_r a plus que doublé avec l'EDTA.

Solution (b) : Acide citrique ———————— 15,8 g
EDTA (0,04 M) ———————— 1,17 g
Solution de NaCl à 9 g‰ – qsp 1000 cc

On ajuste la solution (a) à pH 8,00, à l'aide de la solution (b).

3) Solution de travail de bleu de méthylène au 1/40 de la solution stock.
(à préparer chaque jour)

Solution stock de BM ———————— 0,5 cc
Tampon TRIS citriquè ———————— 19,5 cc

Cette solution est portée au bain-marie à 37°C, 20 minutes avant son utilisation.

II – Test :

1) La cuve de référence

reçoit une suspension d'érythrocytes à une concentration sensiblement identique à celle de la cuve de dosage, soit :

Tampon TRIS-citrique (pH 8,00) ———— 2,75 cc
Sang total ———————————— 0,50 cc

On peut utiliser le sang du sujet que l'on veut tester ou de tout autre sujet. Une cuve de référence peut être utilisée plusieurs fois à condition de l'agiter avant de commencer une nouvelle cinétique.

2) La cuve de dosage

Un premier tube reçoit : Solution de BM au 1/40 ———————— 0,25 cc
Tampon TRIS-citrique (pH 8,00) – 2,5 cc

et on laisse 5 minutes à 37° C.

Durant ce temps, un deuxième tube qui a reçu 1 cc du sang total à tester, est agité assez vigoureusement, à la main, pendant 5 minutes. Puis, sans attendre, on porte 0,5 ml de sang du second tube dans le premier ; on mélange et on porte le tout dans la cuve de dosage et l'enregistrement des D.O. est immédiatement commencé à 660 mμ.

Nous rappellerons que nous avons utilisé le spectrophotomètre SP 825 B à double faisceau, le chariot porteur des cuves étant thermostaté à 37° C. L'enregistrement est poursuivi jusqu'à stabilisation de la D.O.. Celle-ci est acquise au bout d'une vingtaine de minutes environ.

4 - LES RESULTATS.

Nous avons déjà décrit le type de courbe que l'on obtenait (cf. figure 29), et défini deux de ses paramètres : le Δ_{10} et le Tr (cf. p. 59). L'étude corrélative du surnageant nous a montré qu'il y avait coïncidence entre le moment où la totalité du colorant avait disparu du surnageant, et le temps de réduction Tr. Les cinétiques

ainsi réalisées, permettaient une appréciation rapide et très fine (à moins d'une minute près), du temps nécessaire pour que les érythrocytes d'un sujet accumulent et réduisent une quantité donnée de colorant.

Nous avons suivi la chute de cette activité sur du sang en fonction du temps de conservation.

Nous avons étudié l'influence du vieillissement in vitro à court terme. Pour cela, nous avons effectué le test au BM sur 11 sujets normaux : le jour du prélèvement et 2;5 et 7 jours après. Les résultats d'activité jugés sur le Δ_{10} et le Tr ne font pas apparaître de différences bien nettes, selon les individus, durant ce laps de temps. Il est surtout intéressant de noter que le paramètre Tr suit une relation inverse du Δ_{10} pour chaque sujet au cours du vieillissement.

La Figure 33[a] nous montre que la relation entre le Tr et le Δ_{10} prend une allure hyperbolique, confirmée graphiquement (Figure 33[b]) et on peut admettre que $1/tr = 0{,}35\ \Delta 10^{+} (0{,}05 \pm 0{,}17)$

De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de SASS : en effet, durant la première semaine du vieillissement in vitro, la chute d'activité est homogène pour tous les sujets. Passé ce délai, des variations ont été observées par cet auteur qui a montré que l'accumulation du BM. dans ce cas, fournissait un critère d'appréciation de la viabilité.

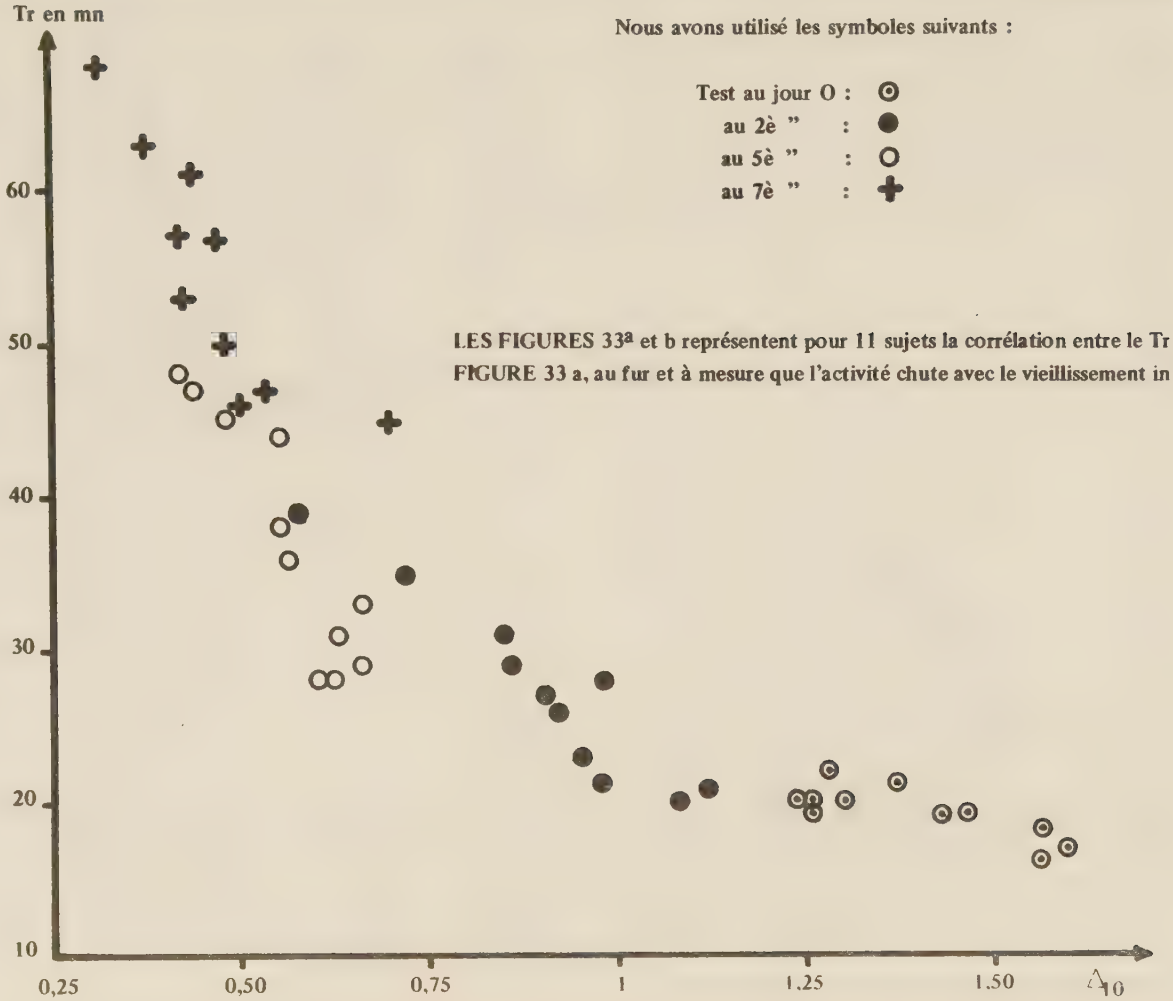
Enfin, on peut retenir qu'il est préférable que le test soit réalisé dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

En dernier lieu, une question se pose : celle de la correction des résultats en fonction de l'hématocrite. Nous ne pensons pas que celle-ci soit nécessaire. Il existe, comme nous le verrons ultérieurement dans un dernier chapitre, une large distribution des paramètres d'activité lorsque l'on étudie des sujets normaux, et l'hypoactivité franche de certains d'entre eux, ne peut pas être expliquée par une diminution de l'hématocrite. Nous avons éliminé cette correction dans un but de simplification, car les paramètres étudiés ne sont pas en relation linéaire avec la concentration de sang (la concentration de BM restant inchangée). (cf. fig. 53)

Lorsque le sang étudié provenait de sujets anémiques, nous avons utilisé des quantités doubles de sang (soit 1 ml), lorsque l'hématocrite atteignait 20 %.

Nous ajouterons que chez le sujet normal, pour de faibles concentrations de sang (de l'ordre de 0,1 ml dans notre test), on observe la disparition du phénomène d'accumulation et de réduction du BM. Ces faits apparaissent en contradiction avec la très large capacité d'accumulation que l'on peut noter avec les concentrations habituelles du test. SASS avait mentionné, et nous l'avons également constaté, qu'il est possible de répéter de nombreuses fois le test sur une même quantité de sang. Il faut remarquer que dans ce dernier cas, on réalise une suite «d'agressions» discontinues : le globule rouge retrouvant un «état d'équilibre» après chaque incubation.

Mais il est possible, enfin, qu'existent des intéractions entre les érythrocytes : celles-ci supposant une certaine contiguïté apportée par une concentration suffisante. Nous envisagerons ultérieurement cet aspect.



Nous avons utilisé les symboles suivants :

Test au jour O : ⊙
au 2è " : ●
au 5è " : ○
au 7è " : ✚

LES FIGURES 33a et b représentent pour 11 sujets la corrélation entre le Tr et le Δ_{10} : FIGURE 33 a, au fur et à mesure que l'activité chute avec le vieillissement in vitro.

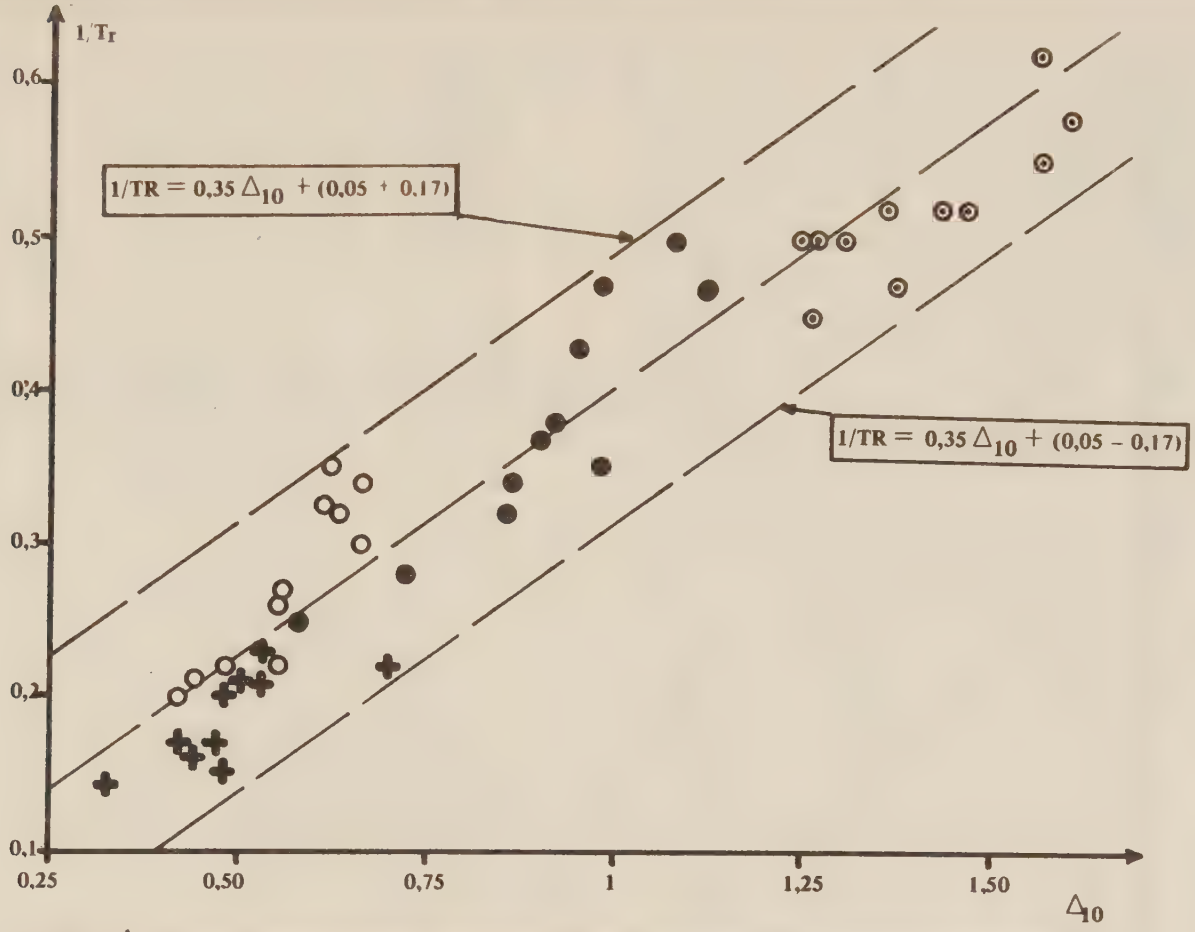


FIGURE 33[b] – indique une corrélation linéaire entre le Δ_{10} et l'inverse du T_r, expérimentalement on trouve : $1/T_r = 0{,}35\Delta_{10} + (0{,}05 \pm 0{,}17)$ avec T_r en mn et Δ_{10} en unité de D.O.. Les symboles sont identiques à ceux de la figure précédente et correspondent aux mêmes sujets.

Au total, l'expression de la capacité des érythrocytes à accumuler et réduire le BM, peut s'exprimer à l'aide de deux paramètres : le Δ_{10} et le Tr. – le premier étant en relation inverse du second et le Tr représentant le temps nécessaire pour que la population d'érythrocyte fixe le colorant. Il nous reste toutefois à essayer de clarifier ce que le Δ_{10} représente intrinsèquement.

Nous avons tenté une approche de cette question en réalisant quelques études spectrales que nous allons envisager.

5 - ETUDE SPECTRALE.

Les lignes qui précèdent, nous ont permis de cadrer les conditions dans lesquelles le BM pénétrait dans l'érythrocyte. Nous avons étudié cette perméabilité au moyen de cinétiques réalisées à 660 mμ sur des suspensions globulaires. C'est ce dernier point que nous allons critiquer en abordant cette étude spectrale.

Nous décrirons les difficultés qu'elle comporte. Enfin, si les résultats obtenus ne permettent pas une définition quantitative fine des phénomènes mis en jeu, nous verrons qu'ils autorisent quelques conclusions. Nous verrons également que ces faits sont en accord avec une étude des cinétiques monochromatiques, qui sera exposée dans le chapitre suivant.

Nous envisagerons d'abord un bref rappel concernant la photométrie des suspensions de particules, puis nous appliquerons ces éléments au bleu de méthylène en solution et au sein d'une suspension d'érythrocytes.

1 – Les données générales

- *Lorsqu'une substance colorée est mise en solution* on peut définir sa plus ou moins grande opacité à une longueur d'onde déterminée à l'aide d'une échelle de densité optique D.O. telle que :

$$D.O. = \log \frac{I_o}{I}$$

où Io et I représentent respectivement l'intensité du rayon lumineux avant et après avoir traversé la solution. Dans ce cas on peut écrire :

pour une longueur d'onde λ donnée, $D.O. = \Sigma_c . C . d$

avec : Σ_c : coefficient d'extinction du colorant (pour λ)
C : concentration de la substance
d : trajet optique

On dit que la loi de BEER LAMBERT est vérifiée lorsque Σ_c a une valeur fixe, ce qui signifie qu'il y a linéarité entre les D.O. observées et la concentration de la substance.

- *Dans le cas d'une suspension d'érythrocytes*

Les variations de D.O. étudiées à la longueur d'onde λ suivent une relation du type :

$$D.O. = \Sigma_h . C_h . d + b,$$

ou : Σ_h : est le coefficient d'extinction de l'hémoglobine à la longueur d'onde λ,

C_h : la concentration de l'hémoglobine en millimoles par litre,

d : le trajet optique en cm.

Enfin, b représente une suite de termes complexes qui tiennent compte de l'hématocrite et de la taille des érythrocytes.

Au total, présentée sous cette forme, l'équation précédente se résume à deux termes : l'un qui est la loi de BEER-LAMBERT pour l'hémoglobine en solution, le second décrivant les phénomènes de diffusion surajoutés. Lorsqu'un colorant se trouve en solution au sein d'une suspension d'érythrocytes, on introduit un facteur supplémentaire dans cette équation.

Dans le cas où le colorant suit la loi de BEER-LAMBERT dans les solutions, on constate qu'il en sera de même au sein des suspensions. Mais on remarquera que dans ce dernier cas, le coefficient d'extinction Σ_c du colorant possède une valeur plus grande. L'accroissement que subit Σ_c est variable ; il est lié selon un mode parabolique à l'hématocrite, et pour 50 %, Σ_c atteint sa valeur maximum pour décroître en deçà et au delà de ce pourcentage (11).

On conçoit que ces phénomènes deviennent plus complexes lorsqu'au départ la loi de BEER-LAMBERT n'est pas vérifiée dans les solutions et il se surajoute une nouvelle cause de variation de Σ_c.

Enfin, signalons que certains colorants peuvent se lier aux protéines plasmatiques. Le résultat est un décalage simple du pic d'absorption.

L'exposé de ces quelques principes de photométrie nous montre les difficultés à réaliser une description quantitative précise. Cet abord aurait nécessité une étude minutieuse que nous n'étions pas certains de faire aboutir, car ces données concernent des colorants inertes dont la situation extra-cellulaire est stable, ce qui n'était évidemment pas le cas du BM. Nous nous sommes engagés vers une détermination expérimentale à l'aide de quelques artifices qui rendent la méthode plus rapide, mais moins rigoureuse. Nous verrons que l'exposé qui précède facilitera la compréhension de quelques résultats.

2 – Cinétique des spectres

Ces quelques préliminaires nous permettent de passer à l'étude cinétique des spectres d'incubats. Mais nous devons souligner que nous l'avons envisagée selon un moyen peu orthodoxe en ce sens que le trajet optique des cuves que nous utilisions était très supérieur à celui qui est habituellement utilisé pour des suspensions aussi opaques (un cm contre quelques centièmes de mm). Ce fait a eu deux conséquences : nous avons réalisé des spectres différentiels avec l'impossibilité de dépasser 600 mμ vers les courtes longueurs d'onde. Afin d'aboutir à une interprétation de ces spectres limités, nous avons présenté les résultats sous la forme d'un schéma à deux longueurs d'onde.

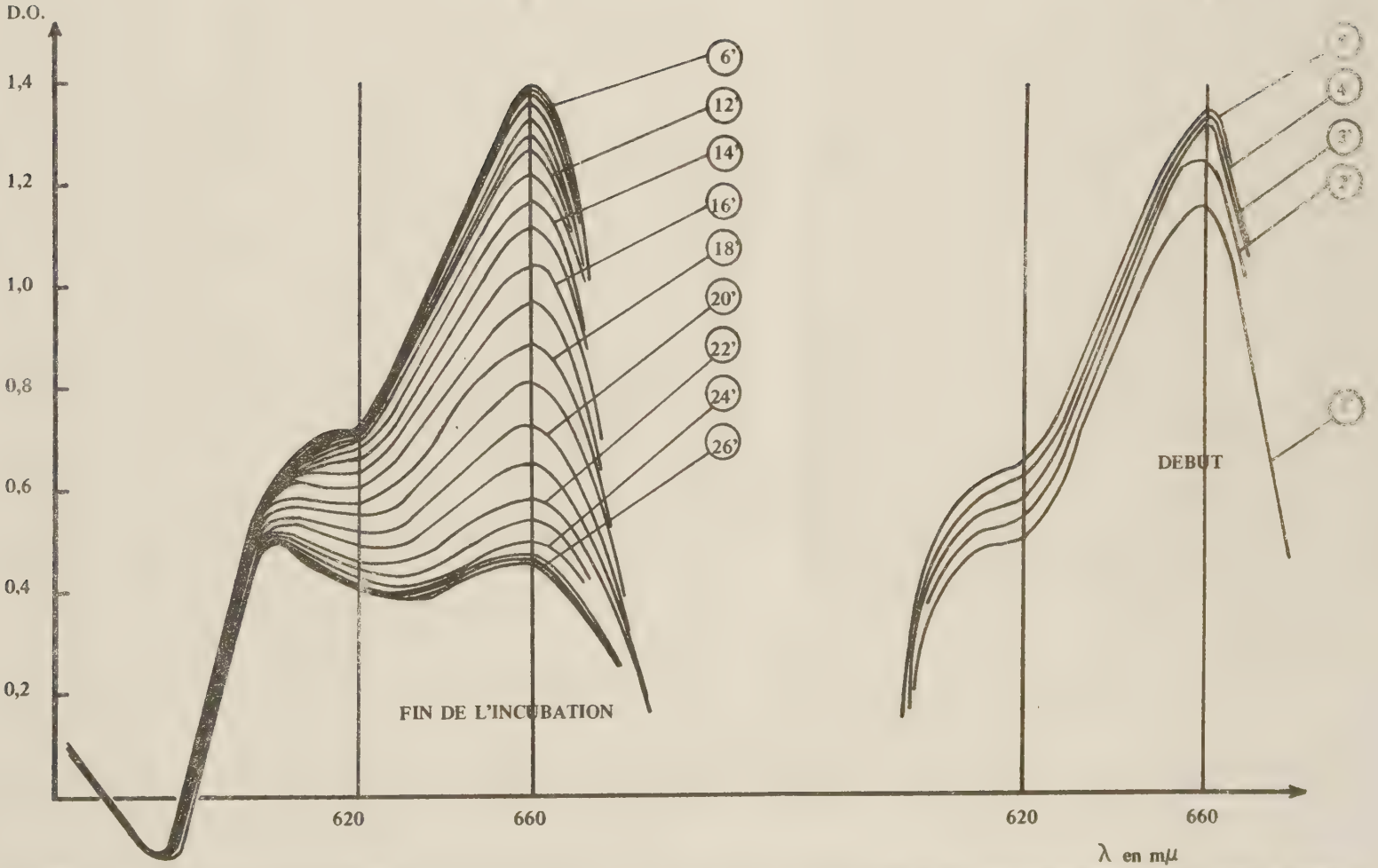


FIGURE 34[a] – Cinétique de spectres réalisée au cours d'une incubation avec le BM selon le protocole habituel. Les chiffres cerclés figurent l'instant, exprimé en minutes, où la courbe a été enregistrée. Pour plus de clarté, nous avons dissocié cette cinétique en deux ensembles l'un (I), situé à droite représente la phase initiale jusqu'à 5 minutes et l'autre qui lui fait suite (II) que nous avons placé à gauche de la précédente.

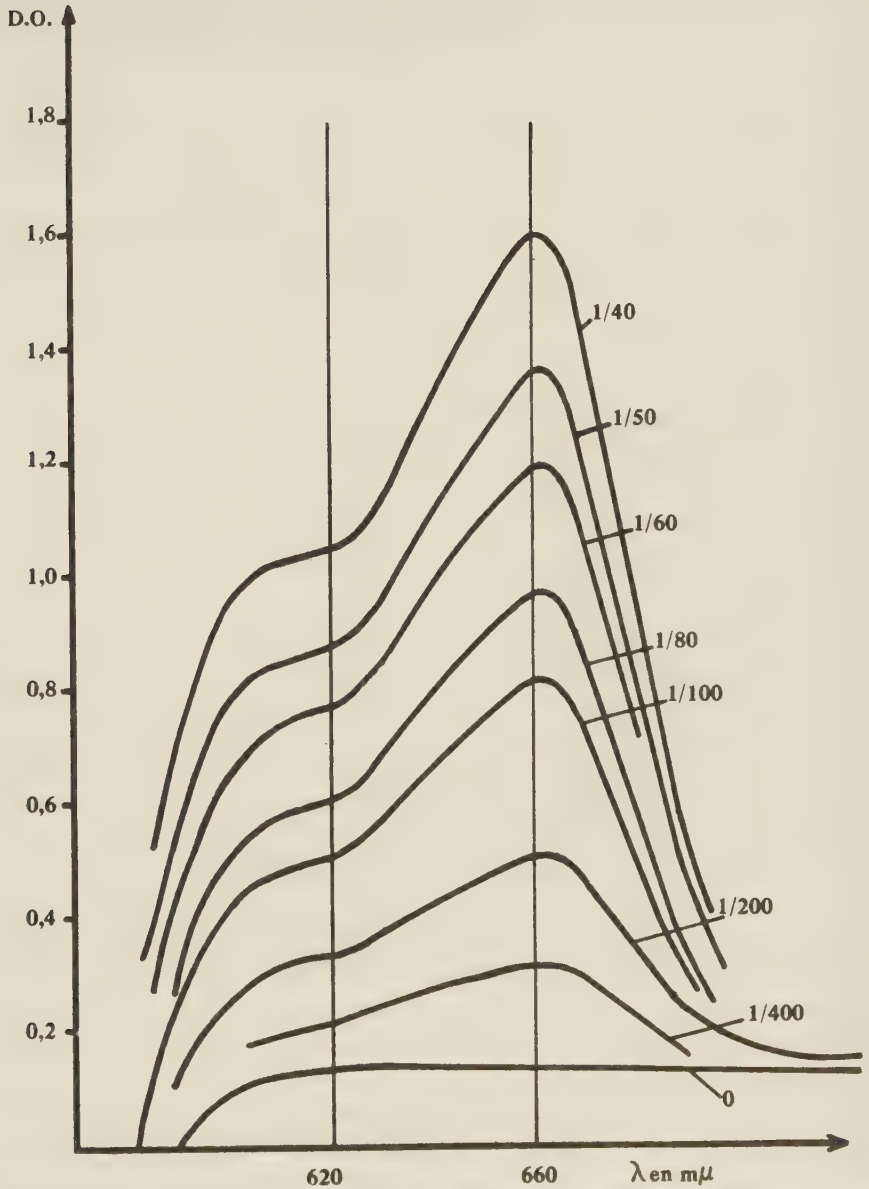


FIGURE 34[b] – Représente une famille de spectres réalisés sur une suspension d'érythrocytes en présence de différentes concentrations de BM; nous avons mentionné pour chaque courbe la dilution de la solution de travail utilisée. Ces spectres ont été réalisés immédiatement après addition du colorant à la suspension d'érythrocytes.

– *Moyens*

Il est possible de réaliser un spectre de la suspension globulaire en incubation avec le bleu. Ce travail a été entrepris à l'aide d'un spectrophotomètre UNICAM SP 825 B et les incubations pratiquées selon le protocole habituel. On établissait des spectres différentiels : la cuve-test étant lue par rapport à une cuve témoin contenant une suspension globulaire de concentration identique. L'enregistrement d'un spectre durait 10 secondes et l'opération était renouvelée toutes les minutes.

Dans ces conditions, on obtient un spectre correct dans un intervalle allant de 600 à 850 mμ. En deçà, les pics considérables (compte-tenu de la concentration) des bandes α et β de l'hémoglobine, interdisent le passage d'un signal et la réponse du photomètre devient indifférente.

– *Résultats*

Nous les avons reportés sur la Figure 34(a) où ils sont chronologiquement dissociés en deux ensembles :

– à droite (Figure 34^a (I) ; les D.O. vont en s'accroissant, cette phase correspondant à la période de délai dans les cinétiques à 660 mμ (cf. Figure 29)

– puis à gauche (Figure 34^a (II) la suite des phénomènes nous montre l'effondrement progressif du pic de BM oxydé.

Nous pouvons constater que la disparition de la forme colorée du bleu n'est pas le seul phénomène en cause. En effet, nous avons simulé (Fig. 34^b), ce qui se passerait s'il y avait accumulation et réduction pure et simple. Ces dernières courbes ont été établies comme suit : une série de spectres étaient réalisés sur une suspension globulaire recevant des quantités décroissante de BM ; les enregistrements étaient faits immédiatement, dans les secondes qui suivaient l'addition de colorant.

En comparant la phase de réduction de l'incubat (Figure 34^a) au modèle simple représenté sur la Figure 34^b, il nous vient deux remarques :

– la diminution de D.O. à laquelle on devrait s'attendre dans la zone de 620 mμ, est plus faible au niveau de l'incubat aboutissant à un spectre final biphasique avec un maximum à 620 mμ et un épaulement à 660 mμ.

– à l'instant correspondant au spectre final, le BM a totalement disparu du surnageant. Si on poursuit l'enregistrement, on n'observe pas de diminution supplémentaire de D.O. à 660 mμ.

Au total, ces faits restent à discuter et nous avons essayé de les rendre plus accessibles en les interprétant à l'aide du schéma suivant.

3 – Schéma à deux longueurs d'onde

Nous commencerons par prendre un exemple simple en étudiant ce schéma dans le cas d'une substance en solution, ce qui nous permettra de dégager le principe et le but de cette construction. Enfin, nous tenterons de l'appliquer aux suspensions d'érythrocytes en incubation avec le BM.

Fig. 35

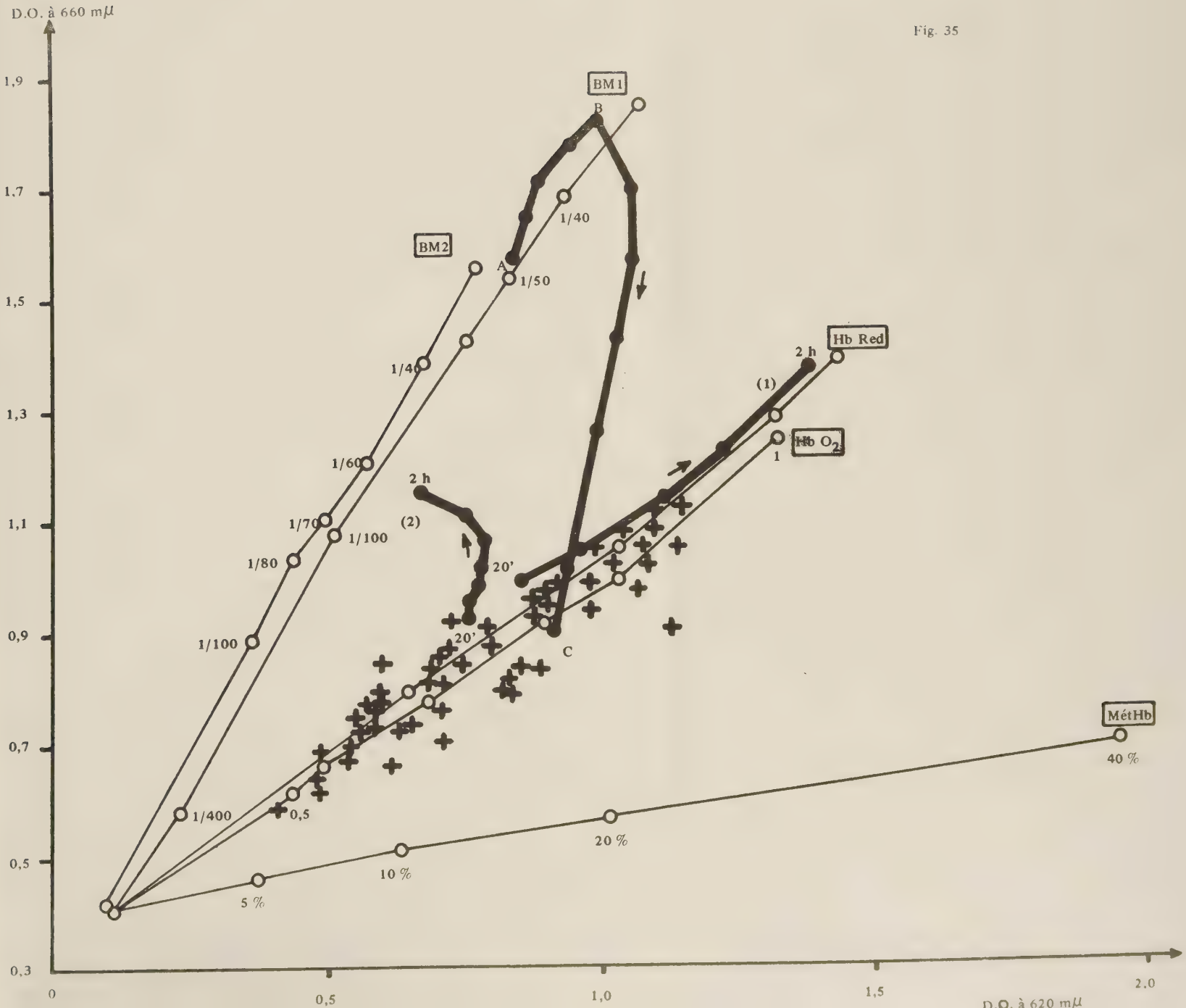

D.O. à 660 mμ
1,9
1,7
1,5
1,3
1,1
0,9
0,7
0,5
0,3
0
0,5
1,0
1,5
2,0
D.O. à 620 mμ
BM1
B
BM2
A
1/40
1/50
1/4
1/60
1/70
1/100
1/80
1/100
1/400
0,5
Hb Red
2 h
(1)
Hb O2
1
2 h
(2)
20'
20'
C
MétHb
40 %
20 %
10 %
5 %

FIGURE 35 –

LA DROITE O.B.M.$_1$: correspond aux variations de concentrations de BM pour une même concentration d'érythrocytes. Par référence au test (cf p. 63), les valeurs de chaque points représentent la dilution de la solution de travail de BM utilisée. Les spectres étaient enregistrés immédiatement après l'addition du colorant.

(Pour mémoire) LA DROITE O.B.M.$_2$: est l'homologue de la droite précédente mais pour des solutions de bleu en l'absence d'érythrocytes, dans ce cas, les spectres étaient réalisés par rapport à une cuve témoin contenant de l'eau distillée.

LA DROITE O.HbO_2 : a été tracée avec différentes concentrations de sang. Par référence au test, les valeurs des points correspondent aux quantités de sang ajoutées, exprimées en ml ; le volume total restant inchange.

LA DROITE O. Hb red. : est l'homologue de la droite précédente, les suspensions étant réalisées en milieu réducteur (Hydrosulfite de soude) à des concentrations plus faibles car l'absorption augmente très rapidement.

LA DROITE O. MétHb : correspond à une suspension d'érythrocytes (dont la concentration est celle du test) à divers degrés de méthémoglobinisation : figurés par le pourcentage sur la droite.

AU SEIN DE CES DROITES DE RÉFÉRENCE, nous avons représenté l'évolution DO à 660 et à 620mμ :

- durant une incubation classique (courbe A, B, C.)
- le nuage de point est tiré de spectres réalisés chez différents sujets, lorsque la réduction intra-érythrocyta du bleu s'est accomplie.
- L'évolution ultérieure est représentée par la courbe (I) ; et dans des conditions d'aérobiose plus marquée par la courbe. (2)

Enfin les 3 courbes, ABC, (1), (2) ont été obtenues à partir de 3 sujets différents. Chacunes possèdent un point correspondant à 20 mn d'incubation avec le bleu. On pourrait tenter de confondre ces trois points, par une translation effectuée sur l'axe O.HbO_2 qui représente les fluctuations apportées par l'hématocrite.

– *Le principe*

Nous l'envisagerons en prenant l'exemple de corps en solution.

Cas d'un colorant rédox

Nous avons constitué des solutions de BM à différentes concentrations en tampon véronal pH 8,00. Nous avons étudié la bande d'absorption maximum dans le visible à deux longueurs d'onde : 660 mμ, qui est le maximum et 620 mμ. Ces mesures nous ont permis de constater que le rapport :

$$\frac{\text{D.O. à 660 m}\mu}{\text{D.O. à 620 m}\mu}$$

était indépendant de la concentration et demeurait constant. En d'autres termes, si on porte ces résultats sur deux axes de coordonnées, avec en abscisse les lectures à 620 mμ et en ordonnées celles à 660 mμ, on observe que les points correspondants aux différentes concentrations s'alignent selon une droite dont la pente caractérise le BM. On constate aussi que la transformation du BM oxydé en leuco-dérivé (à l'aide de solutions réductrices), se fait en suivant cette même droite.

Au total, on conçoit que cette manière de procéder pouvait être envisagée au niveau de l'étroite bande spectrale obtenue des érythrocytes en incubation avec le bleu de méthylène.

– *Application aux incubations*

Nous avons choisi les mêmes longueurs d'onde et nous avons considéré le rapport

$$\frac{\text{D.O. à 660 m}\mu}{\text{D.O. à 620 m}\mu}$$

sur des suspensions d'érythrocytes dont on faisait varier un seul paramètre. Nous avons ainsi étudié séparément quatre variables : le bleu de méthylène, l'oxyhémoglobine, l'hémoglobine réduite, la méthémoglobine. Nous avons constaté que ce rapport gardait une valeur constante pour chaque substance étudiée. Les résultats sont portés sur la Figure 35. La légende de ce schéma détaille le protocole suivi pour la construction de ces droites.

Nous remarquerons que les droites correspondant à l'oxyhémoglobine ($O\text{-}HbO_2$) et à l'hémoglobine réduite ($O\text{-}Hb_{réd}$), sont confondues. Ce fait, ne nous étonne pas car il n'y a aucun pic maximum caractéristique dans la zone étudiée.

Enfin, nous retiendrons le cas du BM. La droite OBM_1 figure le BM au sein d'une suspension de globules rouges. A la seule fin de comparer,la droite OBM_2 est l'homologue de OBM_1 pour du BM en solution (sans érythrocyte). On constate qu'à concentration égale, les D.O. augmentent bien plus rapidement dans le cas du BM en suspension. Cette augmentation du coefficient d'extinction du BM est conforme aux principes énoncés, mais il n'est pas possible de passer de manière simple de l'une à l'autre de ces échelles car la loi de LAMBERT n'est vérifiée que pour les faibles concentrations de colorant.

– *Résultats*

Nous avons appliqué sur le schéma de la Figure 35, l'étude du rapport :

$$\frac{\text{D.O. 660 m}\mu}{\text{D.O. 620 m}\mu}$$

à partir de spectres réalisés selon le test habituel. Puis nous avons étudié l'évolution ultérieure du globule rouge chargé du leuco-BM.

1) Durant la phase d'accumulation et de réduction

d'une durée de 20 minutes environ, elle suit l'évolution de la courbe ABC. Elle comprend :

– Un segment initial : A → B

Il correspond à la phase de délai observée dans les cinétiques monochromatiques (Figure 29). Il semble suivre la droite OBM_1, donc il ne concernerait que des modifications du BM. On remarquera par ailleurs (Figure 29), que durant cette phase, l'étude du surnageant nous montre une disparition assez rapide au début et sans délai du BM. Ces deux constatations nous permettraient de dire que la phase de latence observée dans les cinétiques monochromatiques correspond à une phase d'accumulation pure du colorant sous forme oxydée.

– Le segment BC

Lui fait suite et correspond à la phase de réduction proprement dite. On peut dire que durant cette opération, l'état spectral de la suspension est homogène : en effet, l'évolution est rectiligne. Comme on peut le remarquer, il n'y a pas une disparition simple du colorant, car un surcroît d'augmentation de D.O. à 620 mμ écarte ce segment de la droite OBM_1.

– Au point C

Le globule rouge a accumulé la totalité du colorant et l'incubation est terminée. A ce stade, examiné à l'oeil nu, l'incubat a une coloration plus foncée. Nous avons étudié les spectres en fin d'incubation sur une série de sujets. Lorsque l'on applique ces résultats sur notre schéma (Figure 35), on obtient un nuage de points alignés selon la droite $O\text{-}HbO_2$ (ou $O\text{-}Hb_{Réd}$).

Une distribution aussi étalée ne peut pas s'expliquer uniquement par les fluctuations de l'hématocrite. On peut supposer que chaque point peut être la résultante de deux vecteurs et considérer différentes hypothèses. En premier lieu, ces deux vecteurs pourraient être portés : l'un sur l'axe $O\text{-}BM_1$ et correspondrait à un résidu assez important de BM oxydé au niveau de l'érythrocyte, et l'autre sur l'axe O-MétHb et supposerait un taux de 5 à 20 % de méthémoglobine.

En fait, cette hypothèse semble très peu probable car lorsqu'après une incubation on réalise un spectre sur cette suspension diluée*, on ne trouve pas ces substances qui seraient pourtant facilement décelables.

** Cette dilution, en diminuant l'opacité des suspensions, permet d'obtenir un enregistrement dans toute l'étendue du spectre visible.*

Il est donc vraisemblable qu'il se forme une certaine quantité d'hémoglobine réduite (droite O-$Hb_{Réd}$), ce fait ayant pour corollaire, l'augmentation de consommation en O_2 et la contiguité des érythrocytes.

Au total : L'analyse de ces spectres nous permet de comprendre les données impliquées dans les cinétiques à 660 mμ que nous avons habituellement réalisées dans ce test. Elles nous ont montré que la réduction du BM n'est décelable qu'après une phase d'accumulation du colorant sous la forme oxydée.

Les modifications spectrales observées durant la phase de réduction pourraient s'expliquer par la formation progressive d'hémoglobine réduite. L'état final, étudié selon notre schéma (Figure 35), peut être considéré comme la résultante de plusieurs vecteurs portés sur les différents axes :

– sur O-BM_1 : un vecteur nul : le BM est totalement réduit

– sur O-Met Hb : un vecteur nul : pas de méthémoglobine décelable

– sur O-Hb Red (O-Hb O_2) deux vecteurs : l'un exprimant la fluctuation de l'hématocrite des différents sujets, l'autre la formation d'hémoglobine réduite.

Enfin, une étude plus fine des paramètres des cinétiques monochromatiques, nous permettra de voir, dans un chapitre suivant, que les phénomènes d'accumulation et de réduction semblent tout-à-fait liés.

Auparavant, nous allons, toujours à l'aide du même schéma (Figure 35), étudier l'évolution de l'incubation après 20 minutes.

2) Evolution ultérieure

Nous l'avons suivi durant une période de deux heures environ. Nous avons distingué deux cas :

– en «aérobiose simple» : les cuves subissaient toutes les 30 minutes une brève agitation manuelle pour lutter contre la sédimentation globulaire

– en «aérobiose plus marquée» : les cuves étaient agitées toutes les 30 secondes.

Les résultats reportés sur la Figure 35, nous montrent :

– en «aérobiose simple» une évolution sensiblement linéaire (courbe (1)) et parallèle à l'axe O-Hb Red.

L'étendue de ce déplacement est variable selon les sujets. L'étude du surnageant nous montre que le BM demeure intra-cellulaire. Il semble probable qu'il se forme des quantités croissantes d'hémoglobine réduite.

– en «aérobiose plus marquée» l'évolution se fait selon la courbe (2), et l'on retrouve une fraction du BM dans le milieu extra-cellulaire.

4 – Etude dans le domaine ultra-violet

Les données précédentes concernaient l'étude d'incubations selon le test habituel et comparables au test de SASS en ce qui concerne les concentrations de sang et de BM. Nous avons essayé d'élargir le domaine spectral en diminuant les concentrations de sang. Nous avons déjà mentionné que les phénomènes de perméabilité diminuaient très vite avec la dilution.

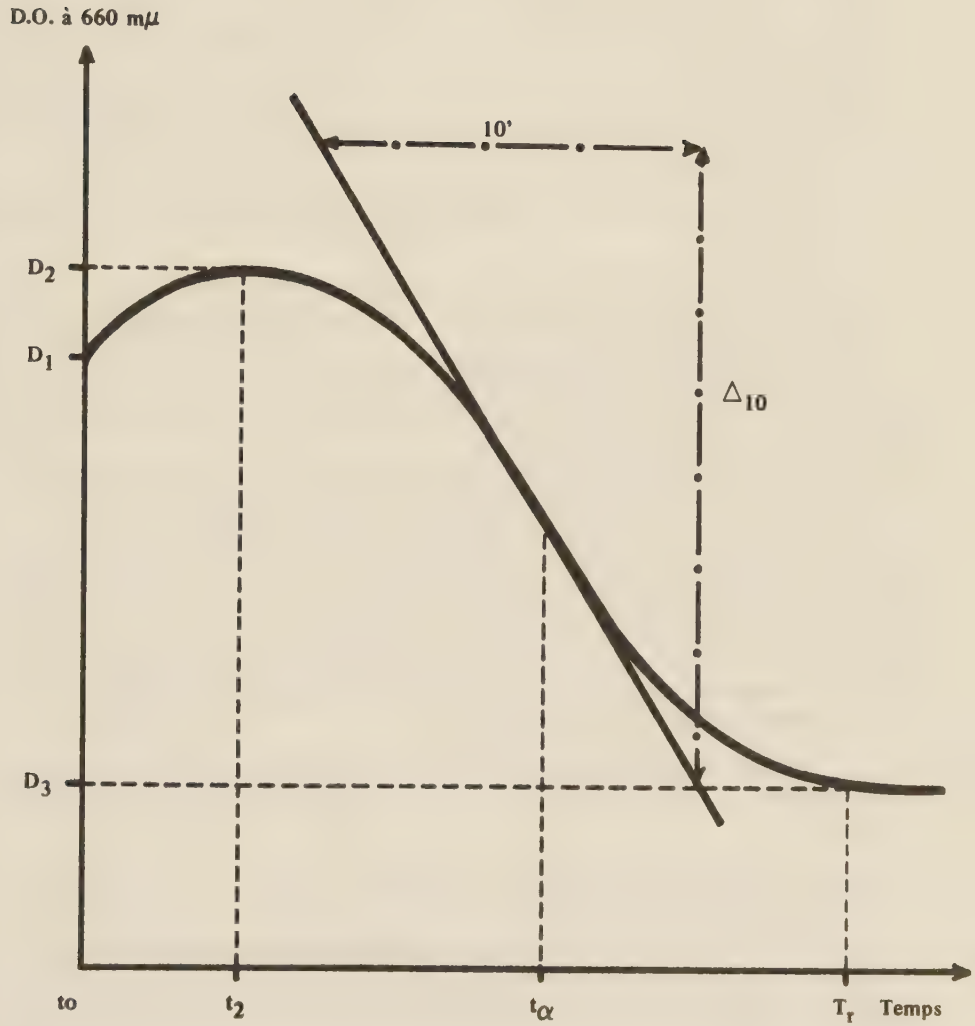


FIGURE 36 – Nous avons figuré les différents paramètres que nous avons étudié corrélativement avec le Δ_{10} (voir le texte).

A une concentration de sang cinq fois plus faible, on obtient la totalité du spectre visible mais aucun résultat notable et le phénomène d'accumulation du colorant a disparu. Pour une concentration dix fois moindre, on atteint le proche ultra-violet. Dans ce cas, l'incubation avec du BM nous montre une modification de la zone de SORET de l'hémoglobine.

Au début, la bande γ absorbe à 420 mμ : on assiste à son effondrement progressif qui s'accuse en une dépression, ne laissant subsister qu'un pic plus faible et décalé à 400 mμ environ.

6 - ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DES CINETIQUES MONOCHROMATIQUES A 660 mμ

Il pouvait être intéressant de comparer la phase initiale des cinétiques qui est une phase d'accumulation pure et la plus ou moins grande activité réductrice que nous avons apprécié ici sur le Δ_{10}.

Nous avons utilisé du sang prélevé sur milieu ACD et provenant de sujets donneurs sains. Ces résultats exprimés en Δ_{10} sont assez étalés mais nous avons vérifié à plusieurs reprises que le test était fidèle.

Cette étude a été complétée par quelques incubations avec le BM en milieu tamponné glucosé. Nous allons définir auparavant quelques paramètres.

Les différentes valeurs étudiées sont réparties sur la Figure 36 D_1, D_2, D_3 représentent respectivement les D.O. initiale, maximum et finale . t_2 l'instant de D_2, et correspond à la durée de la phase de délai. Enfin, t_α est l'instant du point d'inflexion ; Δ_{10} et Tr ont été déjà définis (cf. p.59). Chaque sujet testé était porté sur un graphique avec en abscisse le Δ_{10} et en ordonnée l'une des valeurs énoncées ci-dessus le nuage de points obtenu était généralement facile à interpréter

Ces résultats peuvent se résumer ainsi :

1) Durant la période de délai qui va de t_o à t_2 : il se produit une augmentation régulière de D.O., mais il n'y a pas constitution, à proprement parler, d'un plateau.

2) La D.O. initiale D_1 et la D.O. maximum D_2 sont d'autant plus élevées que le Δ_{10} est important (Figure 37).

3) Le rôle du glucose semble très minime lorsqu'on le compare aux tests réalisés en l'absence de ce substrat. Le Δ_{10} n'est pas modifié et l'on observe seulement une légère diminution des valeurs de D_1 et D_2 lorsque l'on ajoute du glucose au milieu d'incubation.

Au total : Nous avons noté que l'étude du surnageant des incubats nous montrait une fixation sans retard du BM par l'érythrocyte : celle-ci étant assez rapide au début. Les études cinétiques de suspensions globulaires nous ont permis d'établir au contraire l'existence d'un délai durant lequel on note un accroissement des D.O. précédant la réduction intra-globulaire. Par la suite, les données spectrales nous ont montré que du BM oxydé était impliqué dans ces modifications initiales. Le présent chapitre, par les deux premiers points que nous avons analysés, nous permet

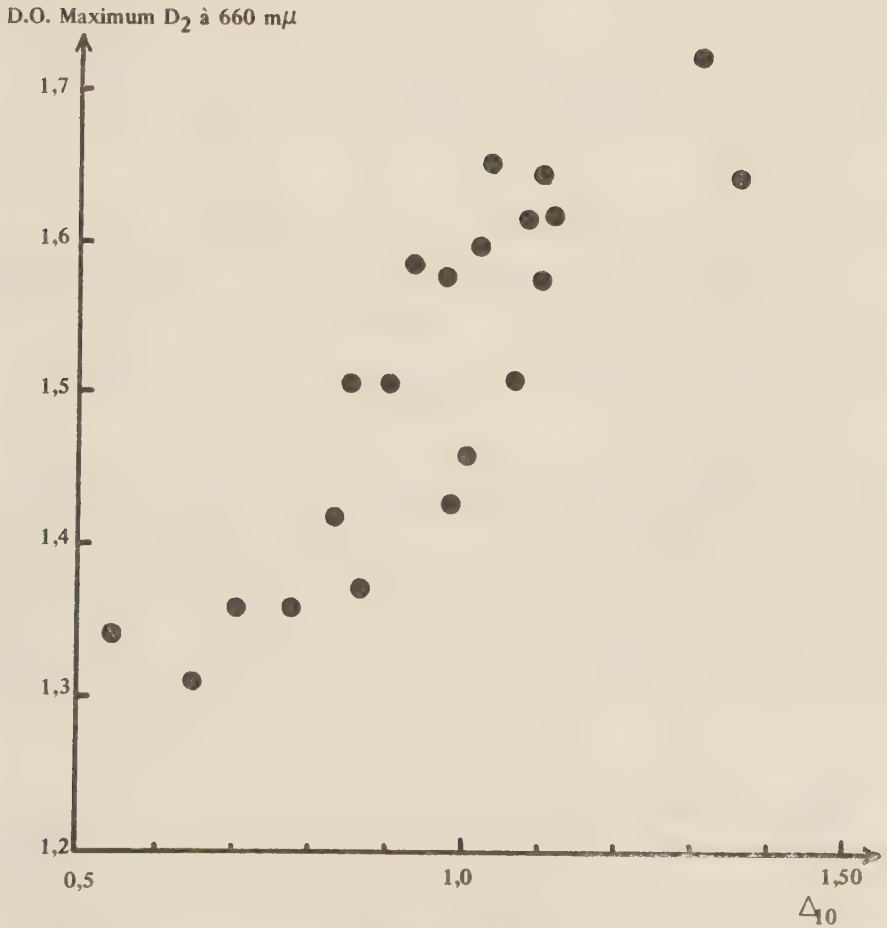


FIGURE 37 – Corrélation entre la D.O. maximum D_2 (cf. Figure 36) et le Δ_{10} au niveau du sang de 21 sujets.

d'ajouter que plus l'accumulation initiale du BM oxydé par le G.R. est importante, plus la réduction du colorant s'opèrera rapidement. En d'autres termes, les premières minutes de l'enregistrement d'une cinétique à 660 mμ, permettent de préjuger des paramètres de la phase de réduction.

S'il était évident – à priori – qu'une régulation puisse exister entre les capacités d'accumulation d'une part et celle de réduction du BM d'autre part, on doit s'étonner de l'absence d'un parfait synchronisme entre les deux phénomènes. Ainsi se trouve posé le problème de la régulation de la voie des pentoses, car si les érythrocytes d'un sujet donné présentent une haute capacité à réduire le colorant, on se demande par quel mécanisme il existe corrélativement la faculté d'accumuler une plus grande quantité de colorant oxydé durant la phase initiale de l'incubation.

2 – ETUDE MICRO-MANOMETRIQUE A L'APPAREIL DE WARBURG –

Nous avons déjà consigné au cours de notre introduction, les principaux résultats à la suite notamment des travaux de BRIN et YONEMOTO, et les problèmes posés par les mécanismes impliqués dans la stimulation considérable du shunt des pentoses par le BM.

C'est ce que nous allons tenter de critiquer dans les lignes qui vont suivre.

– Méthode

Les incubations étaient réalisées comme suit : à 2 ml de sang total (prélevé sur milieu ACD), on ajoutait 0,5 ml de solution isotonique tamponnée en TRIS-citrique 0,025 M pH 8,00 et EDTA, et 0,5 ml d'une solution identique apportant 40 mM de glucose. Le diverticule latéral recevait 0,25 ml d'une solution tamponnée contenant 30 mg % de BM. Lors, des mesures de consommation en O_2, le compartiment central contenait 0,20 ml de KOH à 15 %. Au total, si l'on compare les concentrations de sang et de BM utilisées lors des cinétiques de perméabilité et celles que nous venons de voir, on constate que ces dernières ont été multipliées par un facteur 5 et correspondent aux concentrations habituellement utilisées par divers auteurs.

Les incubats, réalisés à 38° étaient «équilibrés» durant 15 mn, avant de recevoir le BM. Le travail, en ambiance éclairée ne semble pas perturber les résultats. Par contre, l'interruption de l'agitation lors de chaque lecture, notamment lorsqu'elles sont très rapprochées, est très gênante et nous avons pris l'habitude de faire nos mesures sur des manomètres en agitation continue.

Nous avons réalisé cette étude sur des sujets normaux et sur quelques sujets porteurs d'enzymopathies (déficits congénitaux).

– *Résultats*

1) Chez le sujet normal

1 - La consommation en oxygène

En l'absence de BM, nous l'avons déjà dit, elle est très faible et nous ne sommes même pas sûr qu'elle ne représente pas la saturation progressive du sang en oxyhémoglobine.

En présence de bleu, l'érythrocyte présente une forte consommation en oxygène. La courbe des volumes consommés en fonction du temps n'est pas rectiligne et semble se dissocier en deux phases : l'une initiale, durant 60 minutes, d'allure parabolique (la courbe dérivée étant sensiblement linéaire), l'autre, qui lui fait suite, est presque linéaire subissant une très faible diminution de sa pente avec le temps (jusqu'à 3 heures d'incubation).

Les volumes d'oxygène consommés après une heure d'incubation avec le BM, montrent un étalement des valeurs de 500 à 1000 mm^3. 10^{-4} par ml de cellule.

2 - Le quotient respiratoire (ou Q.R.)

Ce quotient est le rapport du volume de CO_2 libéré sur celui d'oxygène consommé à un instant donné. Le volume de CO_2 dégagé était apprécié de manière indirecte au niveau d'un ensemble manomètre fiole dont le compartiment central ne contenait pas de KOH. Nous avons mesuré le Q.R à des intervalles de temps rapprochés (toutes les 5 minutes) et les résultats reportés sur la Figure 38 montrent des valeurs proches de l'unité au début de l'incubation, suivi d'une diminution rapide qui se stabilise après 20 minutes à une valeur, qui chez le sujet normal est comprise entre 0,50 et 0,80.

Remarquons que l'étude du surnageant de centrifugation après 20 minutes d'incubation dans ces conditions, fait apparaître que le BM n'est pas totalement rentré dans l'érythrocyte.

2) Chez le sujet enzymopénique

Nous avons étudié selon cette méthode deux types d'enzymopathies héréditaires : les déficits en G6PD et en pyruvate-kinase.

– Le déficit en G6PD

a) La consommation en oxygène

On devrait s'attendre à une diminution considérable de celle-ci chez le sujet totalement déficient, porteur d'une mutation du type B Méditerranéen. En fait, chez les sujets présentant un taux de G6PD nul, on constate que les valeurs de cette consommation sont variables; elles se situent dans l'intervalle normal dans un cas (Sujet n° 5, Figure 39).

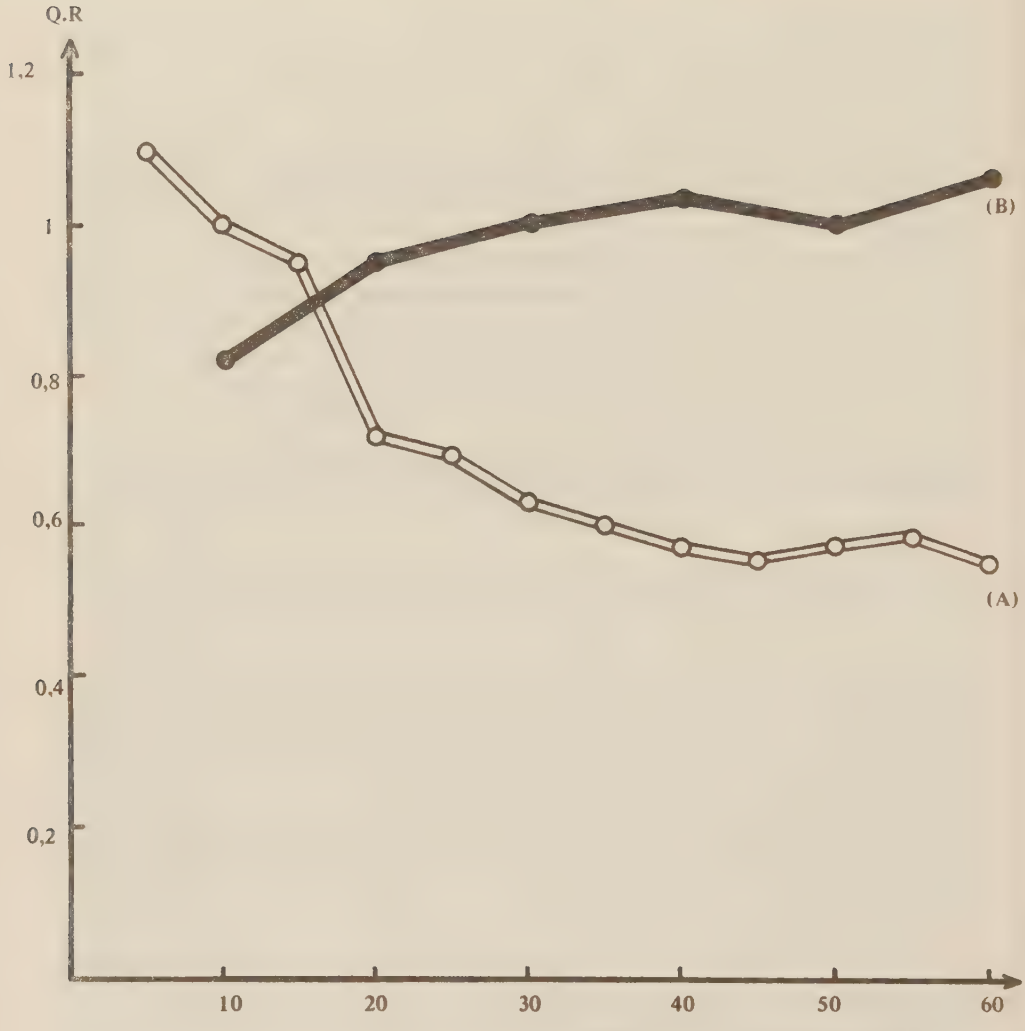


FIGURE 38 – Étude du quotient respiratoire en fonction du temps au niveau d'érythrocytes incubés avec du BM. – A : Sujet normal ; B : Sujet Gr... Aimé, hémizygote pour le déficit en G6PD.

Sujet	Sexe	Consommation d'O_2 en mm^3 10^{-4}/h/ml de cellule	Quotient respiratoire mesuré à 1 h	Activité de la G6PD en U.I
		500 < normale < 1000	0, 50 < normale < 0, 80	Normale = 251 $\pm$ 45UI
1	Mère	452	0, 54	0
2	F	637	0, 46	238
3	F	750	0, 56	324
4	F	719	0, 59	381
5	M	562	0, 64	0
6	F	765	0, 58	295
7	M	265	0, 75	0
8	F	728	0, 62	308
9	F	672	0, 63	316
10	M	253	0, 82	0
11	Père	675	0, 77	214
Gr... Aimé	M	186	1, 07	0

FIGURE 39 - Etude de la consommation en O_2 et du quotient respiratoire au niveau d'érythrocytes de sujets faviques, en présence du BM. (Le dernier sujet Gr... A. n'a aucun lien de parenté avec la famille SPI...).

b) Le quotient respiratoire

La famille Sp..., dont le père est normal mais dont la mère est homozygote pour le déficit en G6PD, nous montre (Figures 39 et 40), au niveau des enfants mâles, (sujets n° 5, 7 et 10, dont l'activité enzymatique est nulle), un Q.R situé dans la moitié supérieure de l'intervalle normal (de 0,65 à 0,80) tout comme le père. Par contre, la mère qui est totalement déficiente (sujet n° 1), ainsi que ses filles (sujets n° 2, 3, 4, 6, 8 et 9, qui sont hétérozygotes obligatoires, avec un niveau d'activité enzymatique normal , présentent un Q.R inférieur à 0,65.

Par ailleurs, un autre sujet (Gr... Aimé), n'ayant aucun lien de parenté avec la famille précédente, et atteint de favisme avec déficit complet en enzyme, nous montre un Q.R constamment élevé et proche de l'unité (Figure 38).

– **Le déficit en Pyruvate-Kinase (P K)**

L'étude de la consommation en O_2 et du Q.R chez deux sujets présentant une chute d'activité enzymatique de 50 %, ne montre aucune modification de ces paramètres.

DISCUSSION

Les mesures de consommation d'oxygène en présence de BM, réalisées par divers auteurs, montrent que celle-ci est linéaire avec le temps. A l'opposé, l'allure parabolique que nous avons trouvé durant la première heure n'est pas claire. Par contre, les mesures de Q.R semblent indiquer une mise en jeu quasi exclusive de la voie des pentoses au tout début durant une vingtaine de minutes, mais très rapidement une autre déshydrogénation (sans libération de CO_2) semble prendre le relai : un état stable étant atteint en moins d'une heure.

Cette seconde source de pyridine nucléotide réduit est probablement située au niveau de la 3-phospho-glycéraldéhyde-déshydrogénase.

En effet, BLUM (174) a montré le rôle inhibiteur du monoiode acétate, sur la consommation d'oxygène, mais cet effet n'est évident qu'à partir de la 20ème minute d'incubation, ce qui est concordant avec nos mesures de Q.R. De plus, la présence du BM déprime considérablement le niveau de fructose 1-6-diphosphate et l'addition de mono-iode acétate dans ce cas élève le taux de ce métabolite , jusqu'à une valeur triple de la normale. Par conséquent, la remontée de la voie des trioses, jointe à la voie des pentoses, n'est pas le seul cycle métabolique responsable de l'accroissement de la consommation en oxygène (174).

En outre, on notera que la lactico-déshydrogénase est probablement dans ce cas une enzyme inactive, car elle ferait perdre une molécule de co-enzyme réduite, en réduisant le pyruvate.

Les dosages de divers auteurs montrent une élévation considérable de ce dernier métabolite au niveau de l'érythrocyte incubé avec le BM. Or, on sait que l'excès de pyruvate (en l'absence d'une forte concentration ionique), bloque la lactico-déshydrogénase (121).

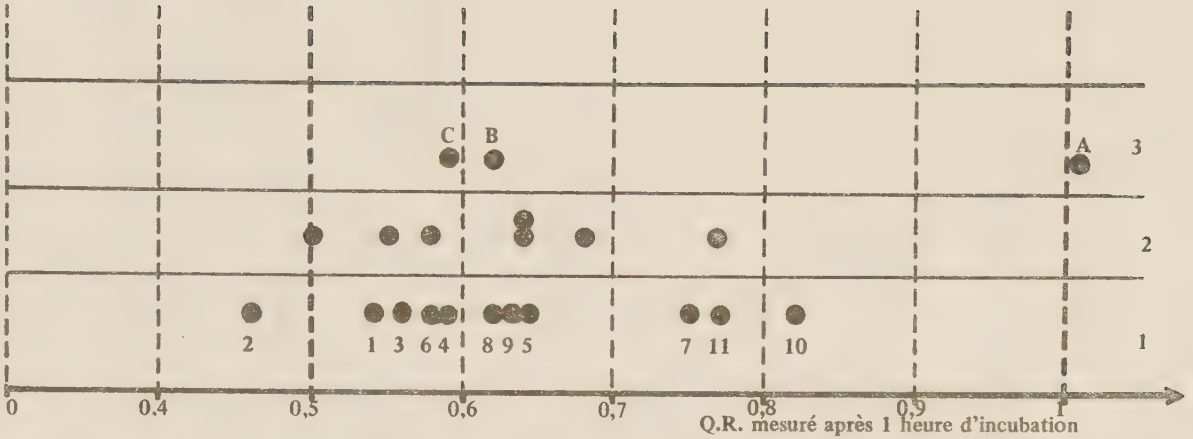


FIGURE 40 – Tableau des quotients respiratoires mesurés après une heure d'incubation. De bas en haut nous trouvons :

1 - La famille Sp... qui est atteinte de favisme. Nous avons numéroté chaque sujet (voir le texte)

2 - Une série de quelques sujets témoins normaux

3 - Le sujet A (Gr... Aimé) est totalement déficient en G6PD

Les sujets B et C sont hétérozygotes pour le déficit en pyruvate-kinase.

Par ailleurs, nous n'avons vu aucune modification de la consommation en oxygène ou du Q.R chez deux sujets déficients en Pyruvate-Kinase. On doit donc admettre l'inutilité de la partie terminale de la voie des trioses, au moins à partir du phospho énol pyruvate dans ce phénomène.

La consommation d'oxygène des sujets totalement déficients en G6PD, est généralement diminuée, mais dans un cas (sujet n° 5, figure 39), elle peut se situer dans l'intervalle normal.

Il est possible que persiste un faible niveau résiduel d'enzyme dans l'érythrocyte intact, cette fraction labile disparaissant lors de la préparation de l'hémolysat pour le dosage.

En effet, nous avons vu que la faible consommation d'oxygène que présente le sujet Aimé Gr... peut être entièrement expliquée par la mise en jeu, ici exclusive, de la voie des pentoses, le quotient respiratoire restant voisin de l'unité durant l'incubation (Figure 38). Par contre, les sujets totalement enzymoprives de la famille Sp... présentent un Q.R situé dans l'intervalle normal, avec toutefois une nuance seuls les sujets de sexe masculin totalement déficients en enzyme, montrent des valeurs situées dans la moitié supérieure de cet intervalle (Fig 40) . quoi qu'il en soit, la Fig 41 où nous avons représenté les valeurs du Q.R. et de la consommation d'oxygène après une heure d'incubation avec le BM, semble indiquer, que ces sujets déficients ont un quotient respiratoire d'autant plus élevé que la consommation d'oxygène est faible Dans ce cas, il semblerait que la mesure de la consommation d'oxygène corresponde à l'activité réductrice de la voie des trioses pour les sujets déficients ayant les valeurs les plus élevées ; à l'opposé, chez d'autres, l'élévation du Q.R rendrait compte de la non utilisation de la voie précédente. Dans ce dernier cas, il apparaîtrait que la seule direction permise serait la voie des pentoses très inefficace car elle commence ici par un goulet d'étranglement et expliquerait la très faible consommation d'oxygène.

Toutefois les mécanismes de la respiration de l'érythrocyte déficient en G6PD, en présence de BM, ne sont certainement pas aussi clairs. On peut notamment se demander par quel processus, après action de l'héxo-kinase, le glucose-6-phosphate formé est orienté, soit vers la voie des trioses, soit vers le shunt des pentoses.

Au total, nous voyons que la respiration de l'érythrocyte en présence de BM, nécessite la fourniture de pyridines nucléotides réduits. Celle-ci semble concerner la voie des pentoses seule, durant les vingt premières minutes de l'incubation. Ultérieurement, les deux voies métaboliques participent à cet apport, la part respective revenant à chacune d'entre elles restant à déterminer.

Enfin, se trouve posé le problème de la nature et de la séquence exacte des chaînes de transport impliquées dans la réduction du BM. Nous avons déjà mentionné les incertitudes qui règnent à ce sujet.

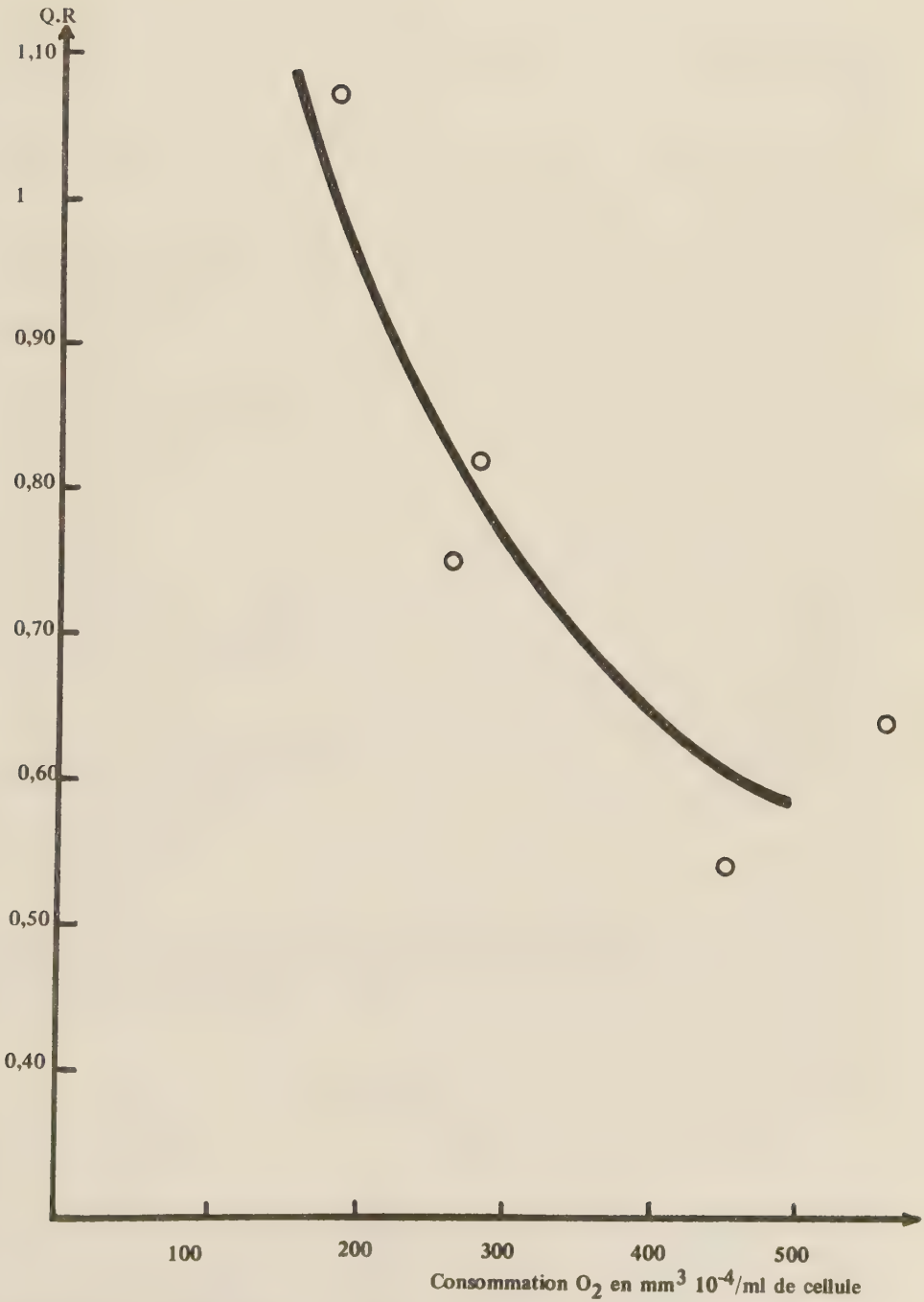


FIGURE 41 – **Relation entre le quotient respiratoire et le volume d'O_2 consommé après une heure d'incubation avec le BM, chez 5 sujets présentant un déficit complet en G6PD.**

3 – LE BLEU DE METHYLENE VIS A VIS DE QUELQUES FRACTIONS CELLULAIRES –

1 L'HEMOLYSAT EN PRESENCE DE BLEU DE METHYLENE.

Nous nous sommes proposés d'étudier le devenir du bleu de méthylène en présence d'hémolysat, à l'aide de moyens essentiellement photométriques en réalisant des spectres successifs limités à l'intervalle visible.

Lorsque les incubations sont effectuées en aérobiose, il est vain de rechercher une réduction franche du BM, même en présence de Glucose-6-Phosphate ou de pyridines nucléotides réduits. Une incubation dissociée en un premier contact avec des stromas puis avec l'hémolysat n'amène aucune réduction du colorant. Ces faits soulignent le caractère d'extrême auto-oxydabilité du bleu de méthylène.

Il existe spontanément un couplage entre le $NADH_2$ ou mieux le $NADPH_2$, et le BM, mais au pH physiologique, le BM leuco-dérivé est immédiatement réoxydé par l'oxygène.

Dans ces conditions, les structures intactes sont seules capables de maintenir le BM à l'état réduit.

Lorsque l'on abandonne un hémolysat durant quelques heures, on observe (sous l'influence de l'oxygène) une lente méthémoglobinisation. On sait que le bleu de méthylène est capable d'accélérer cette oxydation du pigment par l'oxygène. Nous avons pu voir que réciproquement (en l'absence de tout substrat), une solution de méthémoglobine tend nettement à se réduire lorsque du BM est présent. On peut donc conclure que le BM accroît l'instabilité de l'hémoglobine.

De plus, nous avons constaté que l'addition de cyanure à une solution contenant du BM en présence d'hémolysat entraîne des modifications spectrales : au bout de quelques minutes, on observe un effondrement des bandes α et β, puis deux pics α' et β' se reforment, décalés vers l'U.V. par rapport aux bandes initiales (Figure 42). Le pic maximum à 660 mμ n'est pas modifié, mais il existe un soulèvement à 600 mμ. Nous ajouterons que le BM ne décale pas le pic unique (à 535 mμ) de la cyanéméthémoglobine.

Le déplacement des bandes α et β que nous avons observé dans certaines conditions, confirme la possibilité d'interactions entre l'hémoglobine et le colorant, sans qu'il soit possible, en l'état actuel de nos résultats de donner une interprétation claire de ce phénomène.

2 COMPORTEMENT OXYDATIF DES ERYTHROCYTES.

Lorsque l'on envisage les phénomènes rédox au niveau de l'érythrocyte, on pense très généralement aux différentes réactions réductrices de protection mise en jeu contre les agressions oxydantes. On se réfère alors aux mécanismes maintenant l'intégrité des fonctions sulfhydriles de la membrane ou des diverses protéines solubles, à la conservation du stock de glutathion réduit, ou encore à la réduction de la méthémoglobine. Toutefois, il est logique d'envisager que l'érythrocyte est capable de réactions oxydantes. Il possède en effet deux enzymes* lui permettant de détruire l'eau oxygénée, ce

** La catalase et la glutathion-peroxydase.*

péroxyde se formant notamment lorsque l'on incube des érythrocytes en présence d'acide ascorbique. Mais, à l'état normal, le mécanisme exact nous échappe et notamment nous ignorons par quelle réaction les érythrocytes de sujets déficients en diaphorase se méthémoglobinisent progressivement après arrêt du traitement, ou encore l'origine des quelques pour cent de méthémoglobine résiduelle que l'on trouve chez les sujets normaux.

Dans cet ordre d'idée, nous avons étudié le comportement des érythrocytes ou celui de quelques préparations en présence de bleu de méthylène réduit.

Le mérite revient à SASS, d'avoir montré qu'une solution de leuco-BM est beaucoup plus rapidement oxydée en présence de globules rouges. Et cet auteur a remarqué que cet effet est encore plus net au niveau des stromas.

Nous avons pu vérifier qu'il en était ainsi en réalisant une incubation d'érythrocytes selon les concentrations habituelles, mais en utilisant un tampon contenant 300 mg % d'hydrosulfite de soude. Ce fait est d'autant plus marquant lorsque l'on sait que le BM est déjà, par lui-même très auto-oxydable.

L'étude de ce phénomène sur des suspensions d'érythrocytes, se prête mal à une analyse photométrique directe car l'hémoglobine réduite rend ces suspensions très opaques. Elle est au contraire facile sur des suspensions stromatiques. Lorsque l'on étudie le spectre U.V d'une solution d'hydrosulfite en présence de BM en cours de réoxydation, on assiste d'abord à un effondrement progressif jusqu'à la ligne de base du pic de l'hydrosulfite à 317 mμ. En deçà de 300 mμ, on observe l'apparition progressive des pics du BM oxydé, et l'effondrement du pic du leuco BM, mais à ce niveau les modifications spectrales sont trop superposées pour permettre une cinétique. Au total, la vitesse de réoxydation pouvait se juger soit dans l'U.V sur la pente de décroissance du pic d'absorption de l'hydrosulfite à 317 mμ, soit dans le visible au pic maximum du BM à 660 mμ, en étudiant le délai de recoloration : c'est cette dernière méthode que nous avons retenue.

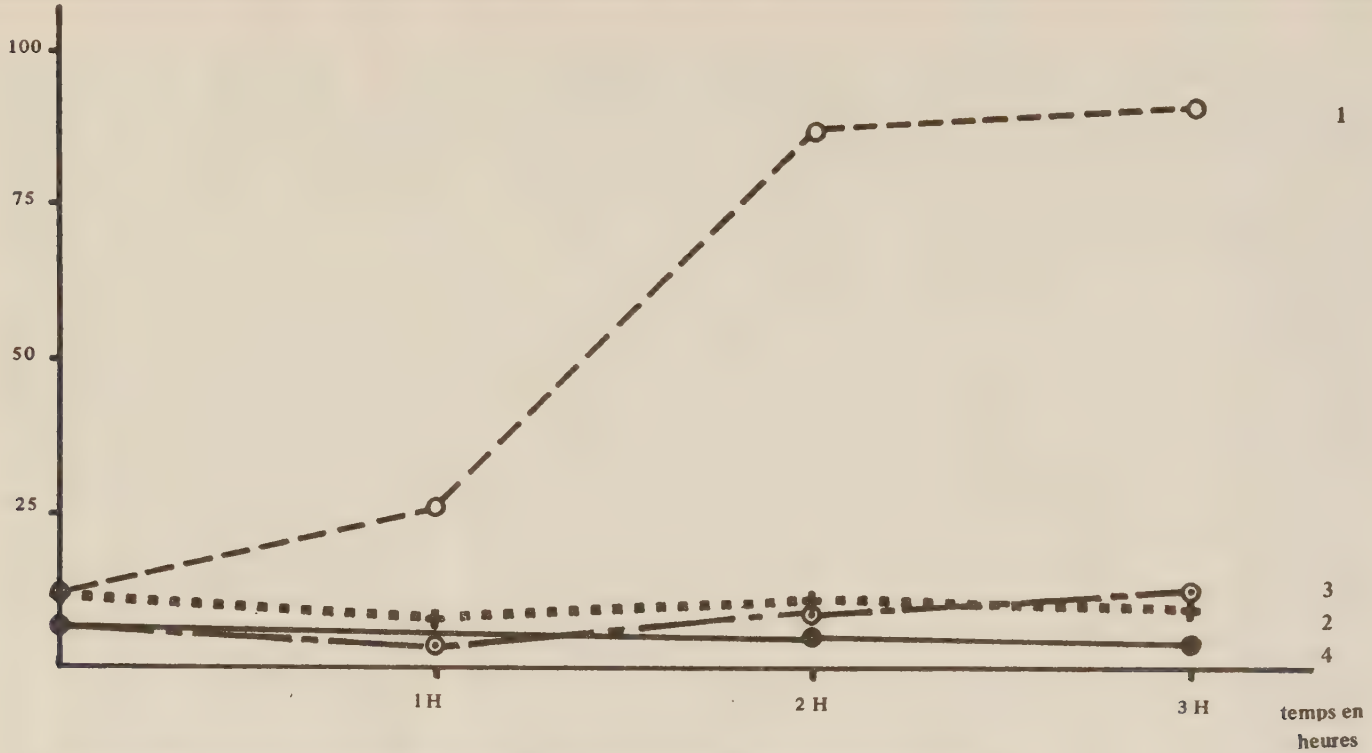
Méthode :

Les stromas étaient préparés par hémolyse en saponine. Le culot était lavé trois fois dans des solutions salines. On obtenait une suspension stromatique débarrassée de l'hémolysat. Cette préparation était diluée au 1/50 par rapport à l'hémolysat brut. L'incubat, d'un volume total de 3,25 ml en tampon TRIS pH 8,00, contenait 0,17 μM de BM auquel on ajoutait 50 μl de dithionite de Na à 1,50 g %. Les incubations avec les stromas recevaient 0,5 ml de la suspension ainsi préparée. La cinétique de réoxydation était suivie à 660 mμ et on comparait la vitesse de réoxydation dans les incubats avec et sans stromas.

Résultats

Il apparaît une accélération très nette de la réoxydation du leuco BM : celle-ci est obtenue en l'absence de stromas au bout de 50 mn environ. Dans les mêmes conditions en présence de la suspension stromatique diluée elle s'accomplit en 35 mn.

On peut se demander dans quelle mesure ces faits correspondent aux phénomènes observés sur des structures intactes et si dans ce cas la membrane n'intervient pas en accélérant la réoxydation du leuco BM.



Méthémoglobinisation spontanée des érythrocytes incubés en aérobiose avec du BM et un réducteur :

1 - érythrocytes + BM + Hydrosulfite : en aérobiose
2 - érythrocytes + BM + Hydrosulfite : en anaérobiose
3 - érythrocytes + BM : en aérobiose
4 - érythrocytes + hydrosulfite : en aérobiose

Fig. 41 bis

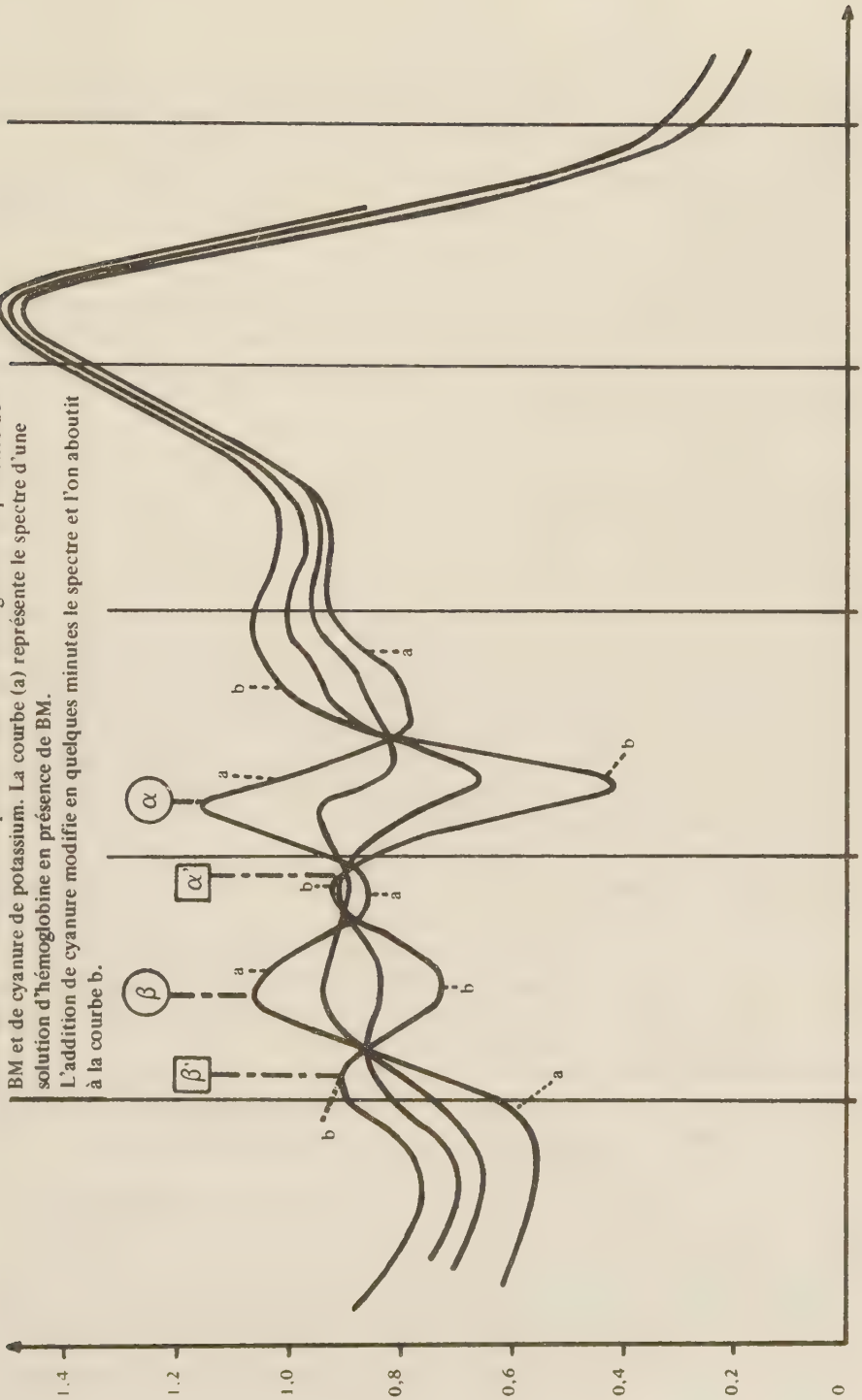


FIGURE 42 – Variation du spectre visible de l'hémoglobine en présence de BM et de cyanure de potassium. La courbe (a) représente le spectre d'une solution d'hémoglobine en présence de BM.
L'addition de cyanure modifie en quelques minutes le spectre et l'on aboutit à la courbe b.

Outre ces divers faits concernant uniquement la réoxydation du leuco BM d'autres modifications intéressantes se produisent au niveau du globule rouge subissant un choc réducteur en présence de BM.

Lorsque l'on soumet une suspension d'érythrocytes à l'action d'une solution de dithionite contenant du leuco BM, on constate au cours de la réoxygénation de cette suspension une méthémoglobinisation paradoxale.

La technique que nous avons utilisée pour cette vérification expérimentale, consistait à réaliser une incubation selon le protocole habituel, la solution tamponnée contenant 300 mg % de dithionite. Le BM se trouve sous forme de leuco dérivé et l'hémoglobine des érythrocytes totalement réduite. La méthémoglobine était dosée selon la méthode de Evelyn et Malloy (70).

Résultats

La méthémoglobinisation ne se produit pas dans les incubats à l'abri de l'air. Par contre, elle semble liée à la rapidité de réoxygénation. Nous avons fait varier ce paramètre de deux manières : soit par une agitation simple du tube contenant l'incubat, soit par une oxygénation plus puissante réalisée à l'aide d'un jet d'air sous pression crevant la surface de l'incubat en agitation. Dans le premier cas, la méthémoglobine formée atteint 20 % dès que les érythrocytes commencent à se recolorer (formation d'oxyhémoglobine), dans le second cas (Figure 41 bis), elle atteint 70 % en deux heures et semble se stabiliser à ce niveau. Ces phénomènes paraissent liés à la présence conjointe de BM et d'hydrosulfite. En l'absence de BM, le taux de méthémoglobine ne dépasse jamais 5 %. En l'absence du réducteur on n'observe pas de méthémoglobinisation avec du BM, que l'incubation soit réalisée en présence de glucose, d'inosine ou en l'absence de substrat dans le milieu.

L'étude de quelques spectres réalisés sur des suspensions érythrocytaires, lors de la réoxygénation en présence du réducteur et du colorant, font ressortir une vitesse de réoxydation bien plus grande au niveau de l'érythrocyte qu'au niveau du réducteur extra-cellulaire. En effet, on obtient le spectre de l'oxyhémoglobine immédiatement après une forte agitation, mais laissé au repos, l'incubat reforme de l'hémoglobine réduite en quelques secondes. De plus, à l'aide de différents colorants redox, nous avons étudié le potentiel redox du milieu extra-cellulaire.

Alors que la méthémoglobine s'est formée au niveau des érythrocytes, on constate que le potentiel redox extra-cellulaire correspond à peine à celui du BM (partiellement recoloré) et lorsque l'on ajoute au surnageant, à ce stade, une solution d'oxyhémoglobine, on observe la formation d'hémoglobine réduite !

Dès lors, cette méthémoglobinisation semble bien une réaction de l'érythrocyte vis-à-vis du stress réducteur, l'oxydation du pigment se réalisant au sein d'un milieu environnant dont le potentiel redox reste bas.

Ce phénomène demeure, pour l'instant, d'interprétation malaisée : il conviendrait notamment de rechercher si la voie des pentoses est impliquée ou non dans ce processus.

CHAPITRE DEUXIEME

PARTICULARITES METABOLIQUES DE L'ERYTHROCYTE NORMAL INCUBE AVEC DU BLEU DE METHYLENE

Le chapitre précédent nous a appris en quels termes l'érythrocyte répondait à la présence du bleu de méthylène et ce, à l'aide de deux moyens d'investigation : l'étude photométrique de la suspension d'une part et à l'aide de quelques mesures micro-manométriques à l'appareil de Warburg d'autre part.

Au cours du présent chapitre, nous tenterons d'approfondir les phénomènes métaboliques impliqués par ce processus en envisageant successivement :

- l'aspect moléculaire
- le rôle des différents substrats dans les mouvements trans-membranaires du BM
- l'influence de quelques inhibiteurs
- les cellules responsables de ces modifications

1 - MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ERYTHROCYTAIRES APRES UNE INCUBATION AVEC DU BM.

Ces modifications portent sur deux compartiments :

- le milieu intracellulaire (de loin le plus important)
- et le milieu extracellulaire.

a) L'étude du surnageant, après une incubation avec le colorant, ne montre normalement qu'une hémolyse extrêmement minime comme il était possible d'en juger sur les spectres réalisés dans la zone de Sorret de l'hémoglobine.

Par ailleurs, l'étude de l'accumulation du BM fait apparaître, après 30 secondes de contact avec le colorant, selon les cas, la fixation de 10 à 20 % de BM au niveau de l'érythrocyte. Ultérieurement, l'accumulation du BM se fait à une vitesse beaucoup plus lente.

L'étude de cette «avidité initiale» pour le bleu nous a montré qu'elle était variable selon les individus, qu'elle n'était pas modifiée en outre par la présence ou l'absence d'EDTA et surtout qu'elle était meilleure aux basses températures (2°C).

b) Modifications au niveau de l'érythrocyte.

Nous étudierons successivement le cas des métabolites intermédiaires d'une part, et des protéines érythrocytaires d'autre part.

1) Les métabolites intermédiaires -

Les travaux de divers auteurs (4, 6, 100, 27 et 139), ont permis d'établir que l'érythrocyte incubé avec du BM augmente légèrement sa consommation de glucose. Le niveau de lactate reste inchangé ou faiblement diminué et celui d'ATP demeure stable.

BLUM remarque après 130 mn d'incubation, une chute du taux de la phosphodihydroxyacétone et du fructose 1-6 diphosphate (respectivement au 1/10 et au 1/7 de leurs valeurs de départ) et une élévation de la concentration de pyruvate qui atteint 15 fois sa valeur initiale (174).

Nous avons recherché d'éventuelles modifications de la concentration de 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG) et de glutathion réduit. (G-SH)

1 - Dosage du 2-3 DPG érythrocytaire -

Ce métabolite était dosé à l'aide de l'acide 4-5 dihydroxy-2-7 naphtalène disulfonique selon la méthode de EATON et BREWER (277)

Il ressort que l'incubation d'érythrocytes avec du BM montre des taux identiques aux témoins durant les deux heures qui suivent l'addition de colorant.

Par ailleurs, le dosage du 2-3 DPG au départ montre des variations, chez les divers sujets, allant de 8 à 12 μM/gHb. Nous avons pu constater qu'il n'existait aucune corrélation entre la plus ou moins grande activité avec le test au BM et le niveau initial de 2-3 DPG.

En conclusion, le rôle régulateur de cet ester vis à vis de la saturation en O_2 de l'hémoglobine ne semble pas impliqué dans des circonstances où l'on stimule artificiellement la respiration de l'érythrocyte aboutissant à une désaturation rapide de l'oxyhémoglobine. Nous noterons que la variation de la synthèse du 2-3 DPG, en fonction de l'hypoxie, apparaît surtout comme un mécanisme à long terme (277)

2 - Dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire

Le GSH a été dosé selon la méthode classique à l'acide 5-5' dithio bis-nitrobenzoique (163).

Les résultats ne font apparaître aucune différence entre le niveau initial en l'absence de colorant et celui observé au cours des premières minutes de contact avec le BM Il semble donc probable que le mécanisme de stimulation de la voie des pentoses par le bleu n'implique pas une oxydation du GSH, mais ce fait sera discuté plus tard

De plus, l'étude du taux de GSH après 20 mn d'incubation, nous montre une élévation moyenne de + 16 % par rapport au niveau de départ (Figure 43).

N° du sujet	% GSH à l'instanto avec BM	% GSH après 20 mn avec BM	% GSH 20' - % GSH T_o
1	60, 2	67, 7	+ 7, 5
2	52, 8	59, 2	+ 6, 4
3	56, 9	71, 1	+ 14, 2
4	57, 6	61, 6	+ 4, 0
5	56, 9	66, 4	+ 9, 5
6	54, 2	57, 6	+ 3, 4
7	44, 0	46, 4	+ 2, 4
8	52, 1	71, 1	+ 19, 0
moyenne	54 mg %		+ 8, 2 mg %

Évolution du taux de Glutathion réduit chez 8 sujets à l'instant 0 et 20 mn d'incubation avec le BM. Le dosage effectué par la méthode à l'acide 5-5, dithiohis-nitro-benzoïque est exprimé en mg pour 100 ml de cellules. Il apparait une élévation moyenne de + 16 % en 20 mn par rapport aux taux de départ.

Fig. 43

Ajoutons que le taux de GSH n'est pas modifié et demeure dans l'intervalle de normalité, lorsque l'érythrocyte accumule du bleu de méthylène à la température de 20°

2) Modifications des protéines érythrocytaires lors d'une incubation avec le BM -

Nous envisagerons successivement le cas de l'hémoglobine et des protéines non hémoglobiniques.

I – L'Hémoglobine –

L'électrophorèse de cette protéine montre des modifications après incubation avec le colorant.

Les migrations étaient conduites à pH alcalin, soit en bande cellogel, soit en gel d'amidon. La révélation était réalisée à l'aide d'une méthode classique : soit à la benzidine, soit à l'Amido Schwartz, mais la coloration des gels n'est pas nécessaire

Après incubation avec le BM, on dénote l'existence d'une fraction hémoglobinique supplémentaire adjacente du côté anodique à la fraction A_1. Il est facile de renouveler quatre fois l'incubation avec le BM sur un même échantillon d'érythrocytes. Dès lors, on constate qu'il existe une bonne proportionnalité entre l'importance de cette fraction et le nombre d'incubations.

Par contre, pour une même dose de BM, la prolongation de l'incubation ne la modifie pas. En d'autres termes, cette fraction est liée uniquement à l'arrivée d'une certaine quantité de colorant oxydé dans l'érythrocyte mais son importance est indépendante du maintien à l'état réduit du leuco-dérivé.

Par ailleurs, on a déjà décrit sous le terme d'hémoglobine A_3, un composé ayant les mêmes caractéristiques de migration électrophorétique que notre fraction supplémentaire. Cette fraction A_3 augmente dans les populations d'hématies âgées et depuis les travaux de Huisman et Dozy (74), on sait qu'elle correspond à la fixation d'un résidu de glutathion par pont disulfure sur chacune des chaînes polypeptidiques β de l'hémoglobine.

Il est donc possible que de l'hémoglobine A_3 se forme lorsque l'érythrocyte est incubé avec du BM. Mais sa signification ne serait pas univoque : il pourrait s'agir – soit d'un stigmate lésionnel contemporain de l'irruption du colorant oxydé qui entraînerait une augmentation transitoire du glutathion oxydé – soit d'une adaptation : Huisman et Dozy ont montré que la courbe de saturation en oxygène de ce composé était décalée vers la gauche.

II – Electrophorèse des protéines non hémoglobiniques –

Les travaux portant sur le comportement électrophorétique de l'hémolysat ont essentiellement envisagé la caractérisation des hémoglobines normales ou anormales.

Néanmoins, quelques auteurs ont abordé l'étude des protéines non hémoglobiniques (N.H.P.) de l'érythrocyte, celles-ci étant révélées, après migration, par une réaction de coloration générale des protéines.

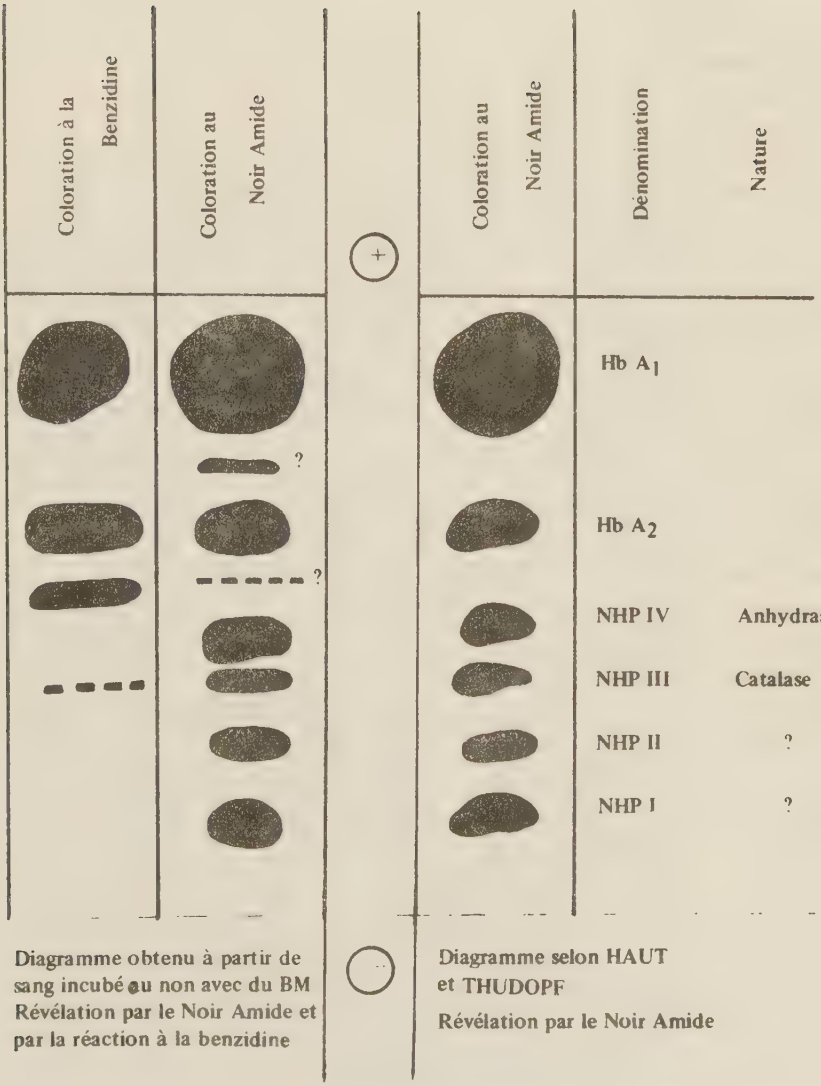


Diagramme électrophorétique des protéines non hémoglobiniques.

Fig. 44

Nous avons utilisé le protocole suivi par A:Hauptet G: Tudhope (178), l'électrophorèse horizontale en gel d'amidon était conduite en tampon discontinu TRIS-EDTA-Borate pH 9,5. La révélation se faisait à l'aide d'une coloration classique au Noir Amide. Les résultats obtenus par ces auteurs dénotent l'existence de quatre fractions : NHP I, II, III et IV, situées en arrière des fractions hémoglobiniques A_1 et A_2. Ils ont démontré que les fractions III et IV correspondent respectivement à l'anhydrase carbonique et à la catalase. Les deux fractions NHP restantes sont de nature inconnue.

Il nous semblait intéressant d'étudier avec cette méthode, l'électrophorégramme d'hémolysats provenant d'érythrocytes incubés avec et sans BM.

Nous avons observé quelques modifications du schéma proposé par ces auteurs, mais l'incubation avec le BM n'apporte aucune variation supplémentaire. Les révélations au Noir Amide nous ont bien montré les 4 fractions NHP avec une faible positivité de la fraction III (catalasique) pour la réaction à la benzidine. Mais il apparaît également, après coloration au Noir Amide, une faible fraction entre les hémoglobines A_1 et A_2 et une autre, entre la fraction NHP IV et l'hémoglobine A_2. Cette dernière composante est nettement colorée lors d'une révélation par la benzidine (Figure 44).

III – Modifications des structures enzymatiques –

Nous avons réalisé des migrations électrophorétiques en gel d'amidon de quelques enzymes de la voie des trioses et du shunt des pentoses phosphates.

On peut retenir que les enzymes tels que :

- la 6-phosphogluconate déshydrogénase
- l'adénosine désaminase
- les DPNH et TPNH diaphorases,

présentent un même profil de migration, qu'ils proviennent d'érythrocytes incubés ou non avec du BM.

A l'opposé, nous avons noté quelques modifications concernant la migration de la G6PD, celles-ci étant liées à la stimulation du shunt des pentoses. Nous allons en exposer les principaux résultats.

– VARIATION ELECTROPHORETIQUE DE LA G6PD –

Les récents travaux de Kirkman, Tsutsui, Chung et Yoshida (50, 43, 179, 180, 44, 45), ont abouti à une conception précise de la forme moléculaire de ce facteur, la G6PD se présente comme un dimère résultant de l'association de deux chaînes polypeptidiques (α et $\in$) liées entre elles par du NADP. La conformation intime des sub-unités polypeptidiques retentit sur le comportement électrophorétique de l'enzyme (44).

Par ailleurs, les recherches de Kirkman ont bien démontré que la structure électrophorétique de l'enzyme pouvait présenter des variations en fonction des conditions expérimentales. Nous avons pu établir que la stimulation considérable du shunt des pentoses phosphates aboutit à des modifications structurales de cette enzyme.

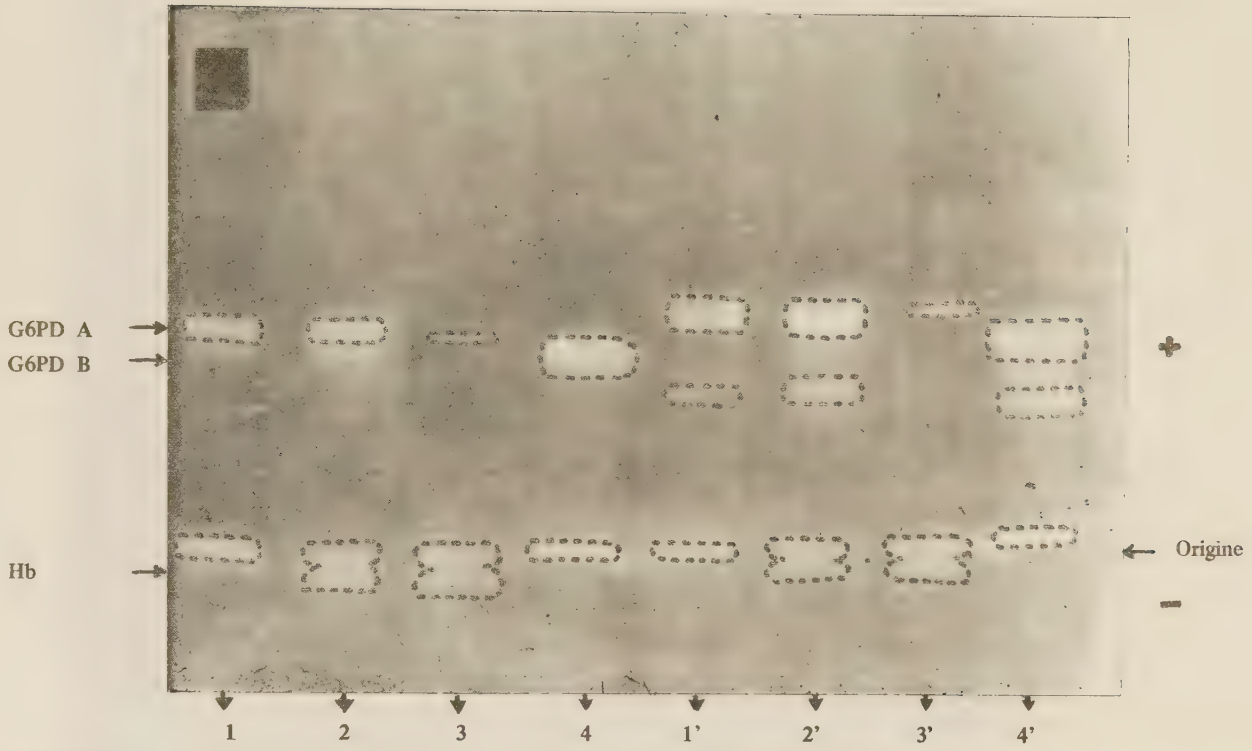


FIGURE 45 –

Electrophorèse en tampon phosphate pH 7,50, en présence de NADP ; 10 Volts/cm/3 heures.

La photo a été prise après 30 minutes de révélation. 1, 2, 3, 4, représentent les hémolysats témoins et 1', 2', 3', 4', les hémolysat homologues provenant d'érythrocytes incubés avec le bleu de méthylène. Les sujets noirs 1 et 2 sont de phénotype A^+ et 3 de phénotype A^-. (De plus, 2 et 3 présentent une hémoglobinose A - S). Enfin, 4 est un sujet blanc de phénotype $B.^+$.

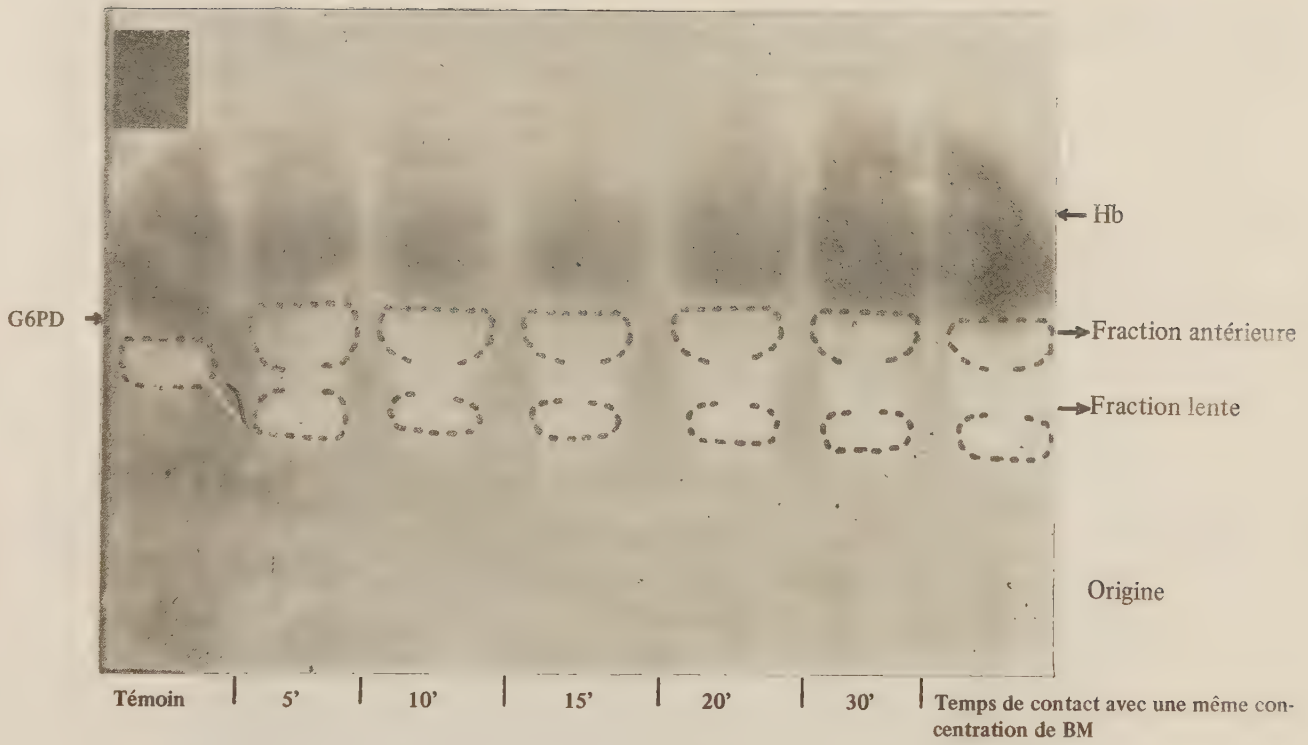

G6PD
Hb
Fraction antérieure
Fraction lente
Origine
Témoin
5'
10'
15'
20'
30'
Temps de contact avec une même concentration de BM

FIGURE 46 a

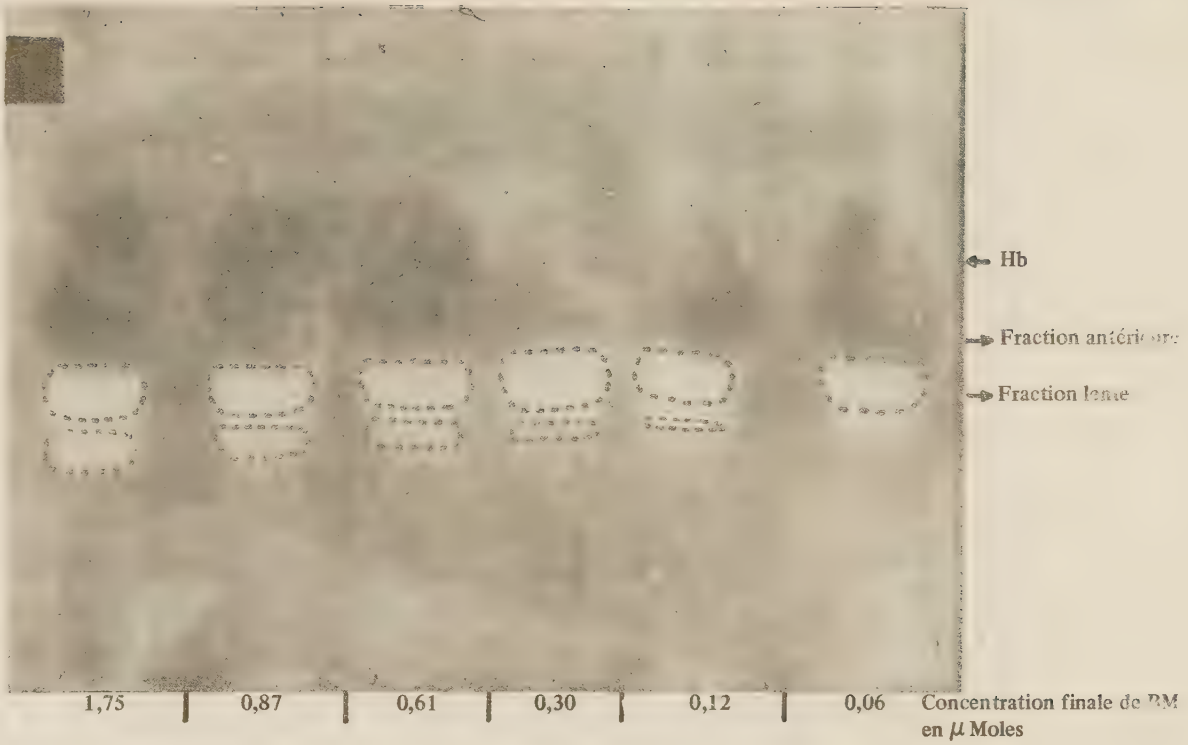


FIGURE 46 b

FIG. 46 a et b – Electrophorèse de G6PD conduite en gel d'amidon en tampon discontinu (selon PORTER & BOYER).

FIGURE 46 a – Il n'existe pas de relation entre le temps de contact des érythrocytes avec le BM et l'importance de la fraction lente

FIGURE 46 b – Il existe une relation entre l'importance de la fraction lente et la concentration finale de BM dans le milieu.

Matériel et Méthode:

Les incubations avec le BM étaient réalisées sur des érythrocytes selon le protocole habituel déjà mentionné (Cf. p.63). Les sujets témoins subissaient un traitement identique : soit une incubation de 20 mn à 37°C en l'absence de BM.

Les électrophorèses étaient conduites soit en bande cellogel (Tampon TRIS-Citrique 0,075 M pH 7,50) soit en gel d'amidon. Dans ce dernier cas, la migration horizontale (avec réfrigération continue par circulation extérieure) était réalisée avec l'un des tampons suivants : soit tampon phosphate pH 7,50 ; 0,20 M dans les cuves et dilué au 1/20 pour le gel, ou tampon TRIS 0,1 M ; EDTA 4,5 mM pH 8,0 pour les bacs et dilué au 1/10 pour le gel ; ou tampon discontinu TRIS-citrique Borate pH 9,00 selon la méthode de Porter et Boyer 181. Dans certains cas, la technique de purification partielle sur colonne de DEAE cellulose, selon Kirkman, a été pratiquée (avec omission du mercapto éthanol).

Résultats:

Le sang étudié recueilli sur solution ACD ou hépariné, provenait de 60 sujets normaux adultes des deux sexes de race blanche prélevés au Centre de Transfusion Sanguine de Toulouse. Nous avons en outre ajouté quelques sujets de race noire originaire du Dahomey. Les migrations étaient effectuées à partir de sangs incubés au préalable à 37°C avec ou sans BM. Dans ces conditions, après incubation avec le colorant la G6PD présente deux bandes en général d'égale intensité et de révélation plus tardive que les témoins : une bande antérieure à peine plus rapide que la fraction habituelle du témoin et une deuxième bande plus lente.

Ce phénomène a été observé également sur le sang de nouveau-né. Chez le sujet noir de phénotype A^+, la fraction lente supplémentaire obtenue après incubation avec le BM est à peine plus rapide que son homologue chez le sujet B^+ traité dans les mêmes conditions (Figure 45). Nous avons établi que ce dédoublement est constant et ne dépend pas du temps de contact des érythrocytes avec le BM (il est pratiquement immédiat (Figure 46[a]), mais il existe une assez bonne relation entre l'intensité de la fraction lente et la concentration de bleu dans l'incubat préalable (Figure 46[b]) et remarquons qu'il est encore visible à la concentration de 0,12 μM de colorant dans le milieu.

Enfin, notons que le dédoublement peut aussi être réalisé avec une incubation de l'hémolysat avec du bleu. Dans ce cas le type d'hémolyse (Saponine ou choc thermique) n'intervient pas et les stromas ne sont pas nécessaires. De plus, si après une incubation avec du BM on méthémoglobinise les érythrocytes avec du Nitrite de Soude, le dédoublement persiste.

Discussion:

Nous avons été amenés à étudier si une incubation des érythrocytes avec des oxydants ou des colorants rédox autres que le bleu de méthylène pouvait produire un dédoublement électrophorétique de l'enzyme. Il ressort qu'après un traitement avec les substances suivantes : le nitrite de soude, le ferricyanure de potassium, le dichloro

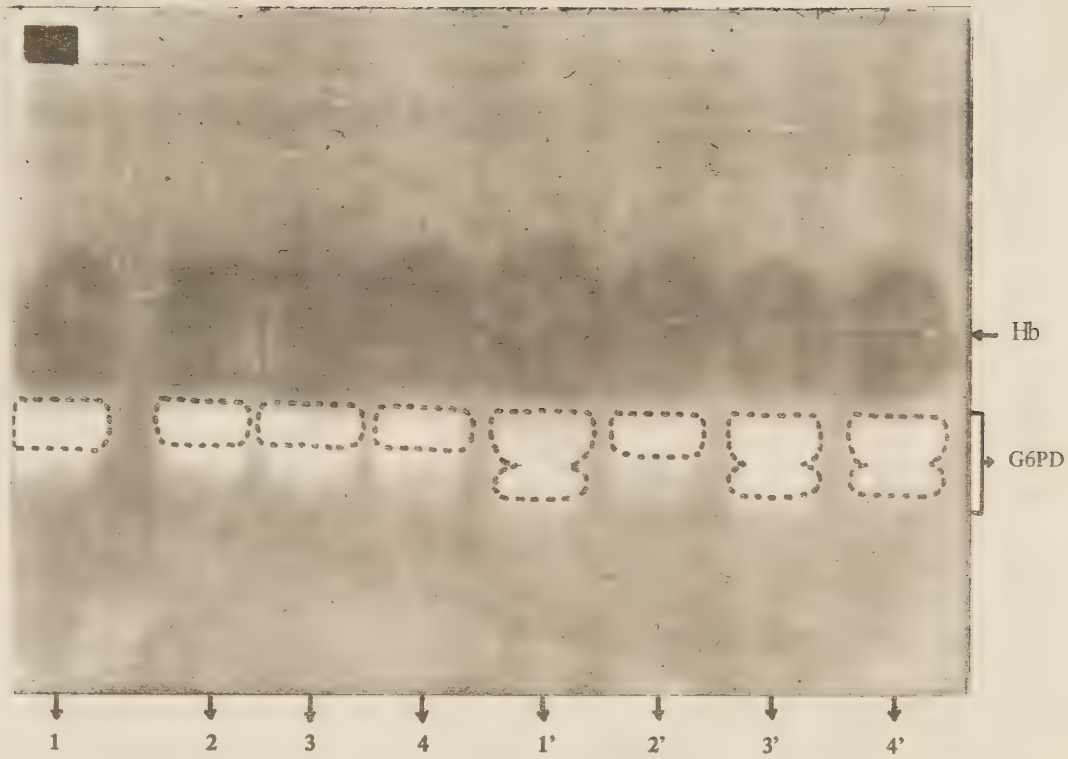


FIGURE 47 – Electrophorèse sur gel d'amidon en tampon discontinu pH 9,00 (selon PORTER & BOYER), à partir de sujets dont le sang a été conservé 36 jours, sur milieu ACD. 1, 2, 3 et 4, représentent la migration après incubation dir[illegible] colorant : la G6PD migre selon une bande unique ; 1', 2', 3' et 4', correspondent aux mêmes sujets mais le traitement a[illegible] BM a été précédé d'une incubation avec de l'inosine : la G6PD des sujets 1', 3' et 4', migre selon deux fractions

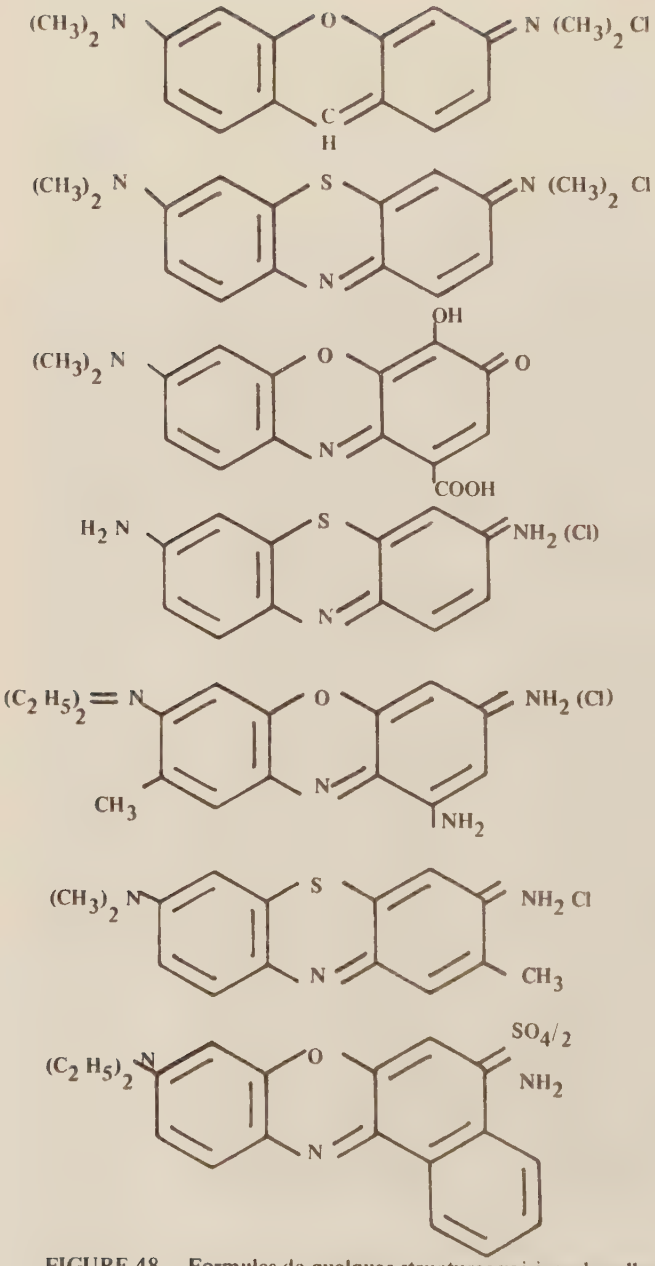


FIGURE 48 – Formules de quelques structures voisines de celle du Bleu de Méthylène.

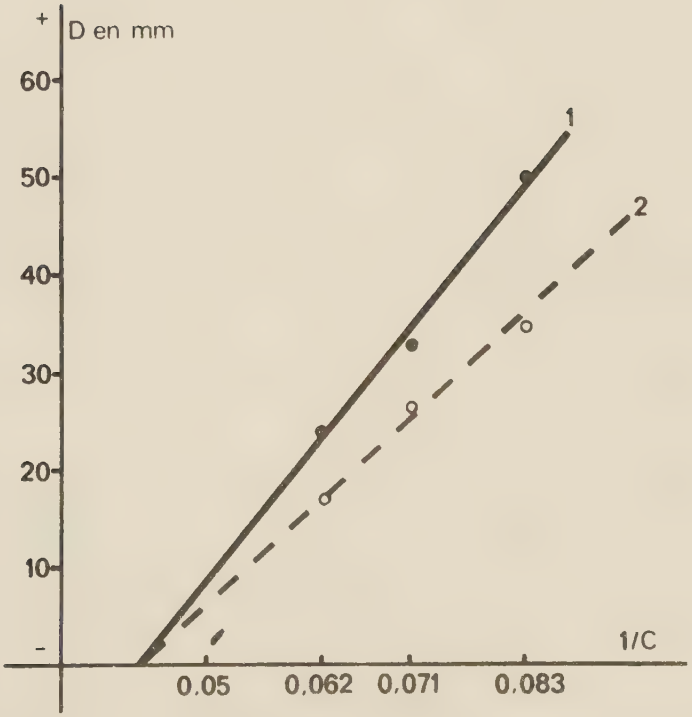


Fig. n°49 - Diagramme représentant la mobilité électrophorétique des deux composants de la G6PD (électrophorèse en tampon TRIS pH = 8,0) en fonction de différentes concentrations en amidon : 12, 14 et 16 g %

En ordonnée : distance de migration en mm ;

En abscisse : inverse de la concentration en gel (exprimée en g %)

Les points de la droite 1 sont communs à la fraction unique de G6PD des érythrocytes non traités et à la fraction rapide dans le cas d'une incubation avec le bleu de méthylène. Les points de la droite 2 correspondent à la fraction lente supplémentaire obtenue avec le colorant.

phénol indophénol, la pyronine, la gallocyanine, la otoluidine, le carmin d'indigo, le rouge neutre, la vitamine C, le sulfate de bleu de nil la G6PD migre en une bande unique. Par contre, un dédoublement net se produit avec le bleu de crésyl brillant (BCB) et la thionine. Cette dernière est un analogue structural (de déméthylation) du BM (Jagarc 48). Enfin, nous remarquons que le BM et le BCB sont tous deux des stimulants puissants du shunt des pentoses et qu'une part de leur action nécessite la presence de la TPNH diaphorase (107).

Nous avons vérifié qu'il s'agissait d'une double forme de la G6PD en effet, une révélation secondaire par diffusion de la 6PGD est exclue car la premiere étape de purification sur DEAE cellulose l'élimine. La G6PD leucocytaire est exclue car les globules blancs sont éliminés de la préparation.

De plus, en l'absence de glucose 6 phosphate, le gel ne donne aucune révélation. Ce dédoublement a été observé à l'aide d'électrophorèses pratiquées en gel d'amidon ou sur bandes cellogel. La révélation classiquement associe à la génération de TPNH en présence de G6P la précipitation du MTT sous la forme colorée d'une base formazan (181).

On adjoint en général dans cette chaîne de transport, un intermédiaire : la phénazine méthosulfate (PMS). En modifiant cet accepteur d'électrons, nous avons essayé de rechercher une éventuelle différence dans la cinétique de coloration de ces deux bandes. Nous l'avons remplacé par différents systèmes :

– soit le bleu de crésyl brillant
– soit le dichloro phénol indophénol (DCIP)
– soit en présence d'hémoglobine et de DCIP

Selon le système utilisé, la coloration est obtenue après des intervalles de temps plus ou moins prolongés mais en aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence une différence dans la vitesse de coloration de chaque fraction. Enfin, le remplacement du glucose-6-phosphate par du glucose et de l'ATP n'amène aucune révélation du gel.

Par ailleurs, nous avons réalisé quelques migrations après inactivation thermique partielle des échantillons. Mais les résultats semblent d'interprétation malaisée.

De plus, l'étude des séparations électrophorétiques avec différentes concentrations en amidon selon Smithies(183)montre (Figure 49), un retard moins important pour la deuxième fraction. Cette dernière aurait donc une taille moléculaire plus faible.

Nous avons pu montrer après incubation avec le BM, qu'il n'existait pas de modification de la fraction mineure rapide antérieure à la fraction principale et décrite par Kirkman. Il suffit d'ailleurs de réaliser les électrophorèses en présence de TPN pour la faire disparaître. Cet auteur a en outre décrit l'existence d'une fraction mineure lente de la G6PD apparaissant dans certaines conditions de migration et d'isolement (181). On ne l'observe que sur des hémolysats récents et elle est labile dans les suspensions enzymatiques conservées ou traitées au mercapto éthanol.

Notre seconde fraction de G6PD apparaissant après action de BM, persiste après purification partielle sur colonne de DEAE cellulose et elle se distingue très bien après migration électrophorétique de la fraction lente de Kirkman car elle possède une mobilité légèrement plus grande.

En outre, ce dédoublement semble nécessiter l'existence d'un métabolisme actif. Ainsi, nous avons étudié quatre échantillons de sang prélevés sur milieu ACD et conservés 36 jours à 4° C. Si l'on applique le protocole habituel, ces érythrocytes demeurent imperméables au BM et la G6PD migre selon une fraction unique. Par contre, si l'on fait précéder le test au BM d'une incubation en présence d'inosine, on constate une pénétration du colorant et 3 échantillons sur 4 présentent un dedoublement de la G6PD (Figure 47).

Par ailleurs, il est impossible de dédoubler avec du BM, la G6PD d'un hémolysat frais qui a été dialysé 15 heures. Par contre, la G6PD de l'hémolysat dialysé est "dédoublée" par le BM lorsqu'on réalise une incubation en présence de G6P* et de NADP ou encore d'inosine. Enfin, ajoutons que la migration électrophorétique, réalisée sur un gel d'amidon contenant du BM ne majore pas la fraction lente.

Au total, la fraction lente supplémentaire obtenue après incubation avec le BM semble correspondre à une molécule dont la masse serait plus faible que celle de l'enzyme normale, mais modifiée dans sa charge.

Son apparition n'est pas conditionnée par le contact de tous les oxydants : seuls le BM et le bleu de crésyl brillant sont capables de la faire apparaitre et nous remarquons que ces deux substances stimulent la voie des pentoses selon un processus bien particulier, car ils nécessitent la présence de la NADPH diaphorase ; nous réprendrons d'ailleurs plus loin cette question. Nous avons déjà montré que la présence de la molécule de G6PD ne suffit pas et que ce dédoublement ne s'observe que sur l'enzyme au contact des substrats. Cette fraction suit le modèle génétique de départ et elle présente une mobilité plus grande chez le sujet A+ que chez sujet B+ . Sa signification demeure obscure et des travaux se poursuivent à l'heure actuelle dans ce sens.

Enfin on peut se demander si un mécanisme commum aux érythrocytes de mammifères, ne préside pas à sa formation, car nous avons pu l'observer sur de la G6PD érythrocytaire de lapin.

2 - LE ROLE DES DIFFERENTS SUBSTRATS DANS LES MOUVEMENTS TRANSMEMBRANAIRES DU BLEU DE METHYLENE -

SASS avait insisté sur la nécessité d'addition de glucose au milieu d'incubation, pour que l'érythrocyte accumule et maintienne le BM dans sa forme réduite intracellulaire. Il remarquait en outre le rôle supplétif médiocre du lactate et du pyruvate en remplacement du glucose. Enfin, avec ce dernier substrat, cet auteur constate une bonne pénétration du colorant quel que soit le mode de recueil du sang (sur solution ACD ou Héparine ou EDTA).

A notre tour, nous allons critiquer cet aspect en envisageant successivement l'incidence de ces facteurs sur la rentrée et sur la sortie éventuelle de BM.

1) La pénétration du colorant

Notre étude a porté sur du sang prélevé selon deux modalités : sur ACD et sur Héparine.

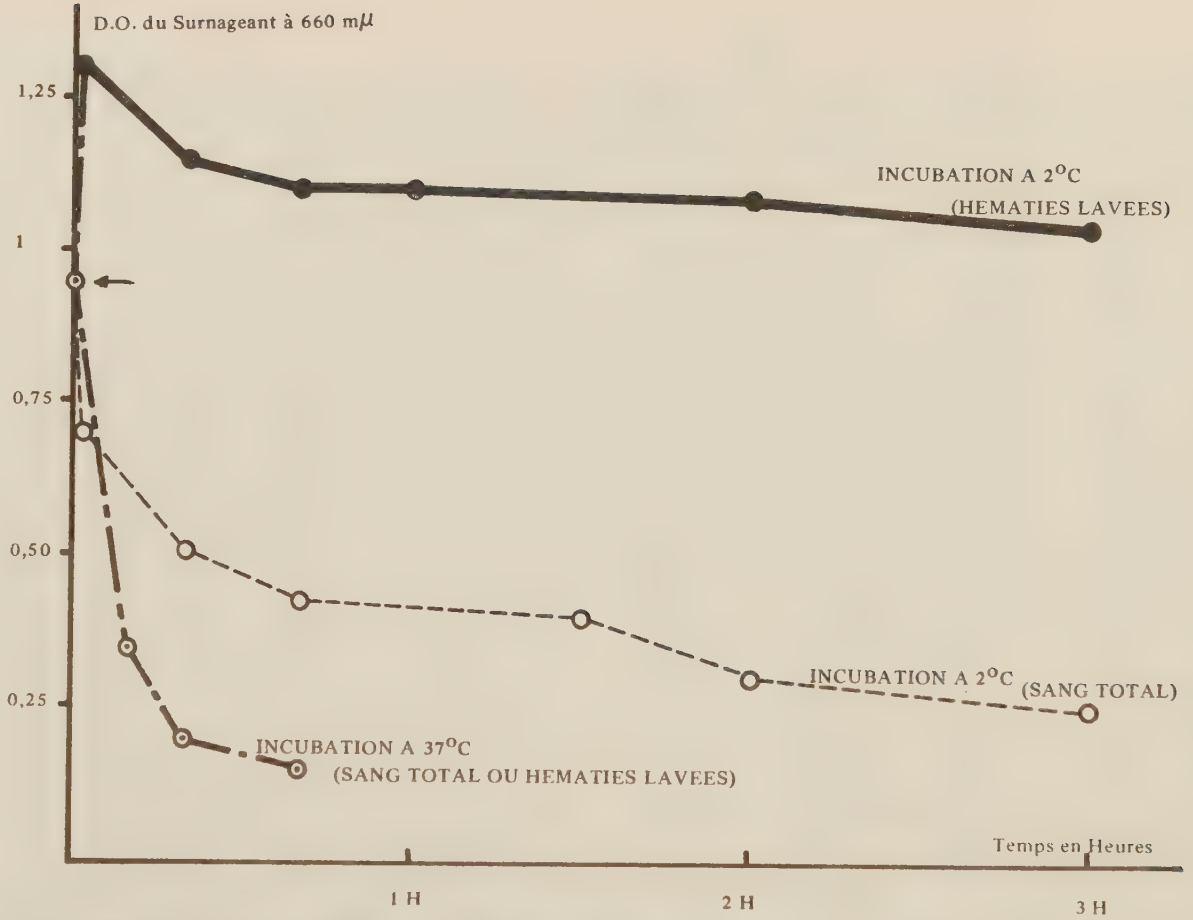


FIGURE 50 – Influence du lavage des hématies (à 2°C) sur l'incubation avec le Bleu de Méthylène à 2°C et 37°C. Nous avons étudié la pénétration du BM en suivant la D.O. à 660 mμ au niveau du surnageant, en fonction du temps.

1 - Le sang recueilli sur ACD :

- Lorsque l'incubation avec le BM est réalisée à 37°C, on observe une bonne pénétration du colorant* lorsqu'on utilise du sang total ou des hématies lavées au préalable à 4°C. A l'opposé, le lavage à température ambiante a un effet inhibiteur parfois total, qui n'est pas corrigé par l'addition de glucose au milieu.

– Lorsque l'incubation avec le BM est réalisée à 2°C, on observe une accumulation du colorant par l'érythrocyte avec du sang total et la presque totalité du BM est fixée par l'érythrocyte au bout de 100 minutes environ. Dans les mêmes conditions de température, avec des hématies lavées, le BM ne pénètre pas, mais sa densité optique est paradoxalement accrue. (Figure 50).

2 - Le sang recueilli sur Héparine :

Dans ce cas, les temps de réduction (Tr), sont très allongés (de 40 minutes environ) et le lavage des hématies avant le test entraîne une inhibition de la pénétration ; celle-ci peut être partiellement levée par addition de glucose ou d'inosine au milieu.

Nous avons résumé toutes ces données au niveau de la Figure 51. Enfin, lorsque des hématies prélevées sur ACD sont incubées en présence de lactate et de BM, on n'observe aucune pénétration.

La nécessité d'une alimentation en substrat semble évidente à priori. On doit toutefois distinguer deux éléments.

– En premier lieu nous trouvons le glucose extracellulaire, apporté par le plasma. Il semble qu'une bonne part de l'inhibition due au lavage des hematies prélevées sur héparine soit imputable à ce fait.

- En second lieu, nous trouvons les réserves érythrocytaires qui peuvent être représentées par du glucose libre ou lié à la membrane (125) auquel il faut ajouter certains esters lorsque le sang est recueilli sur milieu ACD. En effet, CARTIER et LEROUX ont montré que l'abaissement de pH apporté par la solution ACD, entraînait une inhibition de la phospho-fructo-kinase avec accumulation des métabolites en amont tels que le glucose 6 phosphate et le fructose 6 phosphate à des taux 3 fois supérieurs à la normale (27).

Ces métabolites pourraient être utilisés lorsque l'érythrocyte accumule correctement le BM, bien que le glucose extracellulaire ait été éliminé par lavage à 4°C. Toutefois, la possibilité d'accumulation de colorant à 2°C pose le problème d'une activite métabolique réductrice à cette température.

L'accumulation dans ce cas se fait sans modification du taux de glutathion réduit. Mais il est curieux que le lavage des hématies inhibe cette pénétration. La vitamine C circulante pourrait peut-être jouer un rôle...

2) La sortie du BM accumulé par l'érythrocyte

SASS avait montré que le maintien intra-érythrocytaire du BM, en aérobiose nécessitait la présence de glucose dans le milieu extracellulaire.

** Dans les conditions du test habituel, la totalité du BM a disparu du milieu extracellulaire au bout de 20 minutes environ.*

Sang recueilli sur Milieu :	Température d'incubation avec le BM	Après 3 lavages des Hématies à T° ambiante	Après 3 lavages des Hématies à 4° C	Test sur sang total
Acide Citrique Dextrose	37° C	inhibition de la pénétration indifférente à l'addition de glucose	bonne pénétration (en 20 mn environ)	bonne pénétration (en 20 mn environ)
	2° C		inhibition avec BM devenu Hyperchrome dans le surnageant.	pénétration plus lente (en 100 mn)
Héparine	37° C		inhibition partiellement levée par addition de glucose ou d'inosine.	pénétration en général médiocre (40 mn environ)

Influence du mode de prélèvement ; du lavage des hématies et de la température à laquelle il a été effectué ; et de la température d'incubation avec le BM sur la rapidité de pénétration de ce colorant.

Fig. 51

En fait, nos résultats font apparaître un élément très important : à savoir la température de l'incubation. On peut ainsi éliminer la totalité du glucose extracellulaire par lavage et n'observer aucune sortie du BM lorsque les érythrocytes sont maintenus à 20°C.

Par contre, le bleu de méthylène sort assez rapidement lorsque les érythrocytes lavés sont incubés à 37°C.

Enfin, quelques inhibiteurs sont capables de provoquer la sortie du BM.

3 - LES INHIBITEURS -

SASS nous avait déjà appris que les substances méthémoglobinisantes et le monoiode acétate s'opposent à la pénétration du BM ou provoquent la sortie du colorant accumulé au cours d'une incubation préalable.

Nous allons étudier l'influence d'autres inhibiteurs, dont l'effet sur l'érythrocyte normal est partiellement connu, au moins pour certains d'entre eux.

1) Le parachloromercuribenzoate (P.C.M.B.)

JACOB et JANDL ont montré (66) que cet organo-mercuriel ne pénétrait pas dans l'érythrocyte et ne déprimait pas le taux de glutathion réduit. Son effet se limite à un blocage des fonctions sulfhydriles de la membrane.

Nous avons étudié, par rapport à un lot de témoins, la pénétration du BM au niveau d'érythrocytes au préalable incubés avec du PCMB. Dans ce cas, le test était réalisé avec un tampon où l'EDTA était évidemment exclu.

Dans ces conditions on n'observe aucune modification de la perméabilité au colorant, après traitement au PCMB et nous pouvons conclure qu'une fonction SH membranaire n'est pas indispensable.

2) L'ion cyanure

De longue date, on savait que les solutions de cyanure de potassium bloquent la catalase au niveau d'érythrocytes intacts. Nous avons observé une inhibition totale de la pénétration du BM lorsque l'on ajoute 1 mg (soit 15 μM) de cyanure de potassium, au milieu d'incubation habituel.

Le cyanure employé aux mêmes concentrations est aussi capable de provoquer la sortie du colorant accumulé lors d'une incubation préalable. Mais nous remarquerons que cet effet dépend de la température. A 2°C, le BM accumulé ne sort pas des érythrocytes et l'addition de cyanure n'a aucun effet. A température ambiante, la sortie du colorant est très nette et elle est encore plus importante à 37°C.

L'étude de la quantité de colorant exclue en présence de cyanure au bout d'un temps donné, croît régulièrement avec l'augmentation de température. Il n'existe donc pas un «seuil thermique».

3) Les sels de chrome

Ils agissent sur l'érythrocyte à deux niveaux.

– d'une part, le chrome peut se fixer sur la molécule d'hémoglobine au niveau de la chaîne β. PRINS et LOOS (100) ont montré que cette fixation ne pouvait se faire qu'à la condition que l'érythrocyte possède un stock suffisant de glutathion réduit.

Le chrome hexavalent ne pourrait pénétrer dans l'érythrocyte qu'après réduction sous la forme trivalente, par le glutathion réduit.

– d'autre part, le chrome est capable d'inhiber le glutathion réductase de l'érythrocyte intact (68). Cette inhibition ne se produit qu'en milieu réducteur. Ainsi, on ne l'observe, au niveau de l'hémolysat, qu'après addition de $NADPH_2$ et l'érythrocyte de sujets déficients en glucose 6 phosphate déshydrogénase se montre réfractaire à une telle inhibition (54).

Nous avons réalisé le test au BM sur des érythrocytes témoins et incubés au préalable avec le chromate de soude selon le protocole de Koutras (68). Dans ces conditions, on observe une légère augmentation du Tr au niveau des érythrocytes traités avec le chromate de Soude. Notons que ce composé n'a aucun effet sur la sortie du BM accumulé par l'érythrocyte.

4) LE DESFERAL (ou méthane sulfonate de desferioxamine B).*

Cette substance est largement utilisée en thérapeutique dans les surcharges en fer. De faible poids moléculaire, elle posède une assez bonne diffusion cellulaire. Sa propriété essentielle réside dans la formation de complexes stables avec l'ion ferrique.

Nous avons étudié la perméabilité au BM en présence de différentes concentrations de ce chélateur.

Nous avons, au besoins, corrigé le pH des solutions de chélate, afin de toujours réaliser un essai au pH optimum de 8,00.

Sur la Figure 52 nous avons reporté les résultats de cette inhibition. Pour des quantités voisines de 100 mg soit 50 mM ajoutées au milieu habituel, on observe une inhibition totale.

On peut donc conclure que l'ion ferrique est nécessaire à la pénétration du bleu, sans que nous puissions préciser pour l'instant, la nature libre ou liée de celui-ci.

5) L'Ion Cuivrique

L'ion cuivrique a été utilisé sous forme de sulfate de cuivre. A la concentration finale de 0,25 mM on note une inhibition totale. On remarque en outre qu'après incubation avec cet inhibiteur, le BM est devenu hyperchrome : les D.O. du surnageant mesurées après 20 mn dépassant les D.O. initiales.

6) L'E.D.T.A. (Ou Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique utilisé sous forme de sels disodiques).

L'addition de cette substance au milieu d'incubation nous montre un effet inhibiteur variable selon les sujets testés.

** Gracieusement mis à notre disposition par les Laboratoires CIBA.*

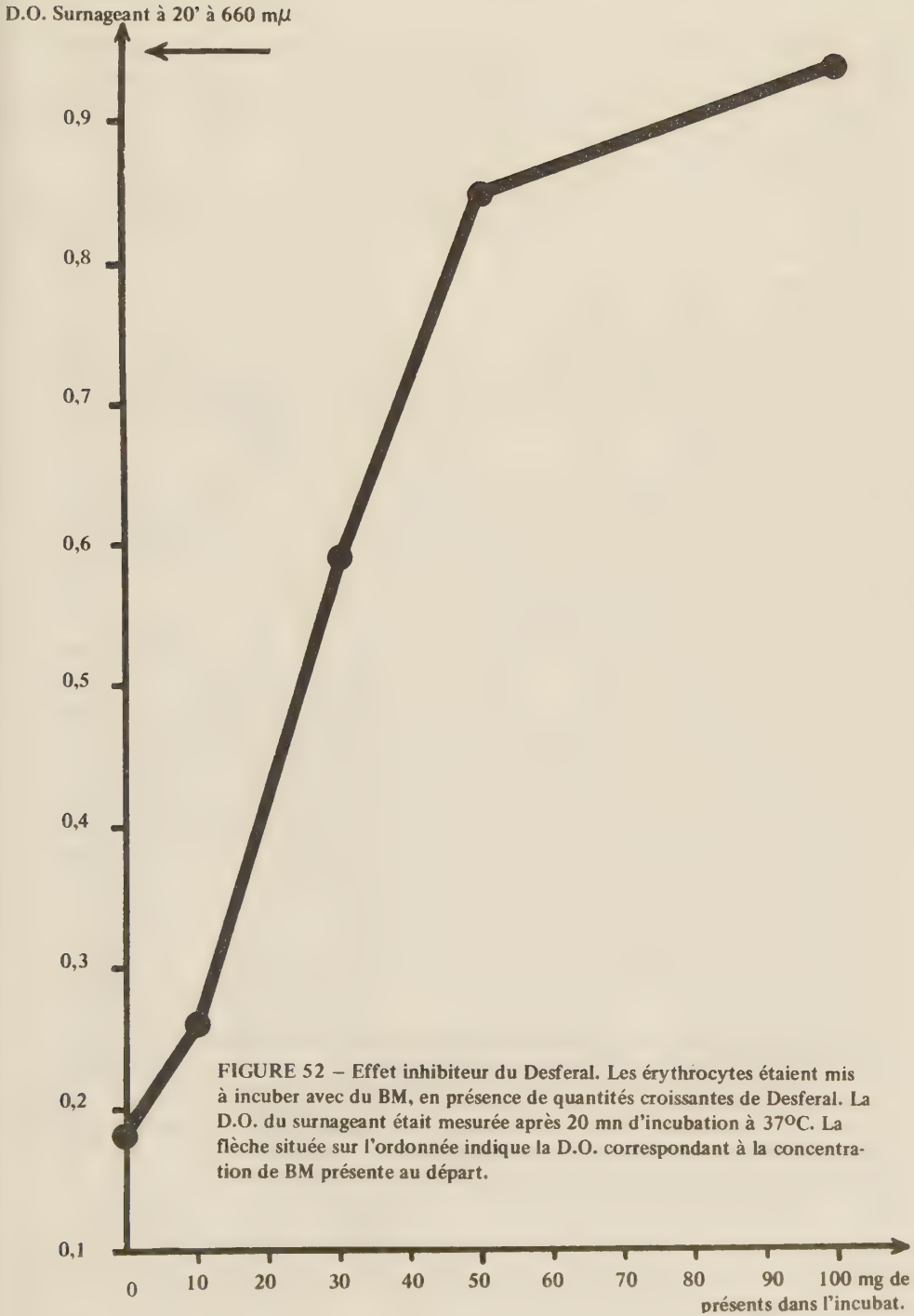


FIGURE 52 – Effet inhibiteur du Desferal. Les érythrocytes étaient mis à incuber avec du BM, en présence de quantités croissantes de Desferal. La D.O. du surnageant était mesurée après 20 mn d'incubation à 37°C. La flèche située sur l'ordonnée indique la D.O. correspondant à la concentration de BM présente au départ.

Nous avons déjà mentionné qu'il pouvait être impliqué dans une réduction photochimique du BM en solution, sous l'influence d'un éclairement intense. Mais nous avons pu établir qu'un éclairement modéré ne modifiait pas les propriétés d'absorption.

Nous avons déjà indiqué que l'EDTA n'avait jamais un effet stimulant, mais parfois un effet inhibiteur assez important (Cf. Figure 32).

Il ne semble pas que l'EDTA agisse ici par son action chélatrice des métaux lourds, car nous avons vu que le parachloromercuribenzoate n'a aucune influence sur la perméabilité au BM.

Nous avons vérifié que l'EDTA n'intervenait pas dans la phase de fixation initiale du BM au niveau de l'érythrocyte.

Il nous paraît intéressant de comparer l'effet de l'EDTA sur l'accumulation du BM et sur la consommation en oxygène. En effet, il est curieux de noter que l'EDTA stimule la consommation en O_2 d'érythrocytes incubés avec le BM. La fig. 52 bis nous montre très nettement cet effet.

Au total l'EDTA gêne l'accumulation du BM (cf fig. 32) et stimule la consommation en O_2 en présence du BM. Il est donc bien possible que cette substance interfère au titre d'intermédiaire rédox qui réoxyderait plus rapidement le BM réduit : augmentant le consommation d'O_2 et génant d'autant la pénétration du bleu. Nous avons essayé de préciser le point d'impact métabolique de l'EDTA.

Lorsque nous avons étudié la stimulation de la consommation en O_2 par le BM (cf chapitre 1, § 2), nos résultats sembleraient faire ressortir une participation exclusive de la G6PD durant les 15 premieres minutes. Par la suite, la consommation en O_2 serait en rapport avec une activité réductrice mixte issue à la fois de la voie des Pentoses et de celle des trioses. Or, il est très interessant de constater que l'effet stimulant de l'EDTA sur la consommation en O_2 érythrocytaire avec le BM est surtout net au tout début de l'incubation : cf fig. 52 ter. C'est la raison pour laquelle nous placerions l'EDTA au niveau de la voie des pentoses, avec pour fonction la réoxydation du leuco BM lorsque celui-ci a été réduit par la NADPH diaphorase, l'interférence de l'EDTA au niveau de l'activité réductrice de la voie des trioses nous apparaissant très minime.

En conclusion, l'étude de ces différents inhibiteurs de la pénétration du BM dans l'érythrocyte nous a montré :

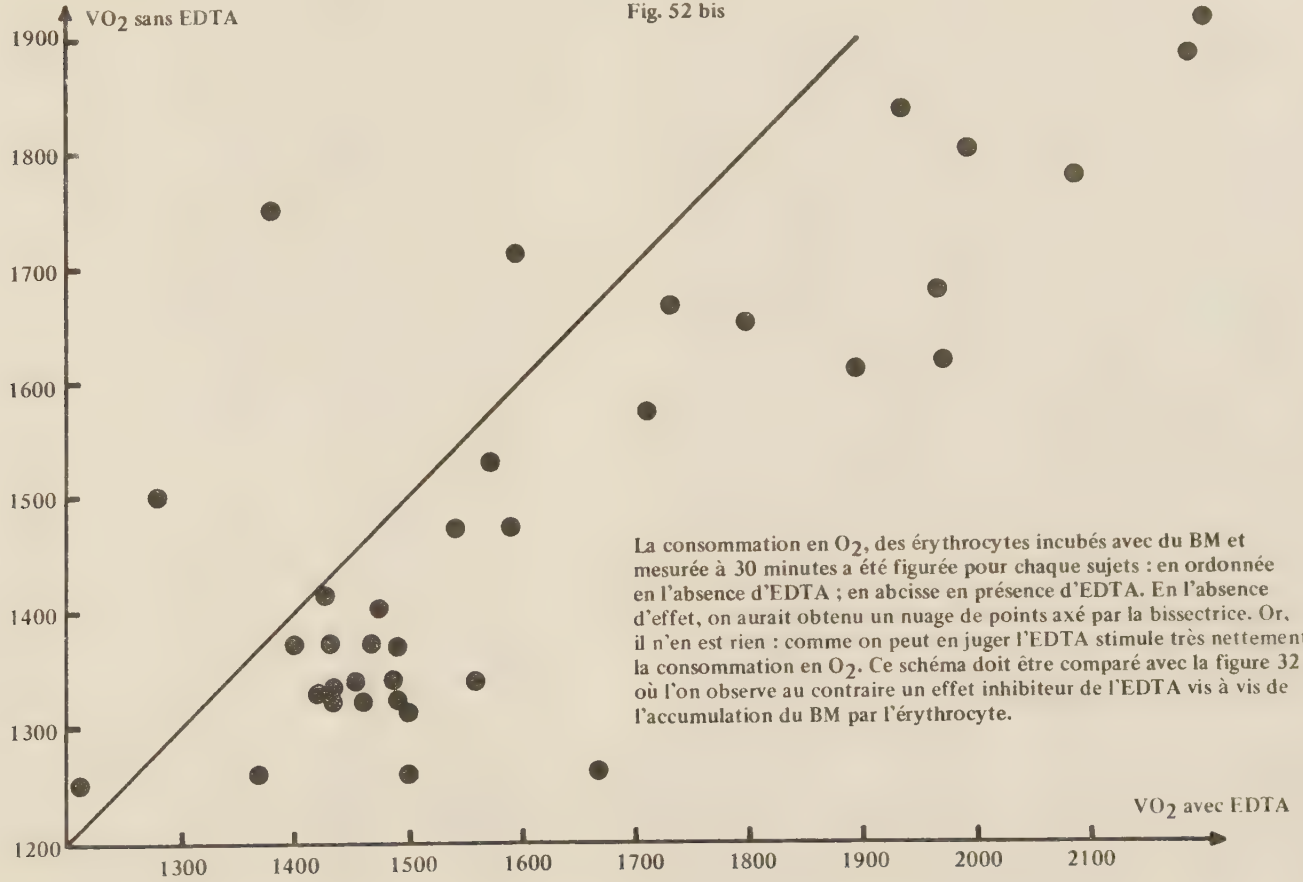
– un effet inhibiteur de l'EDTA qui interfère dans la chaine de réduction du BM par la voie des pentoses ;

– une inhibition incomplète avec les sels de chromes, ce qui permet peut-être de penser que la glutathion réductase n'est pas une enzyme indispensable, dans le cas qui nous intéresse ;

– une inhibition totale avec le cyanure et le Desferal, laissant supposer la nécessité de la catalase et peut-être d'un cofacteur ferrique ;

– enfin une inhibition très sensible par l'ion cuivrique.

Fig. 52 bis



La consommation en O_2, des érythrocytes incubés avec du BM et mesurée à 30 minutes a été figurée pour chaque sujets : en ordonnée en l'absence d'EDTA ; en abcisse en présence d'EDTA. En l'absence d'effet, on aurait obtenu un nuage de points axé par la bissectrice. Or, il n'en est rien : comme on peut en juger l'EDTA stimule très nettement la consommation en O_2. Ce schéma doit être comparé avec la figure 32 où l'on observe au contraire un effet inhibiteur de l'EDTA vis à vis de l'accumulation du BM par l'érythrocyte.

4 - LES CELLULES RESPONSABLES ET LEURS INTERACTIONS -

Le sang circulant présente trois lignées cellulaires :

– Les plaquettes

– Les leucocytes

– Les érythrocytes

Nous avons déjà mentionné l'hétérogénéité métabolique de ces derniers. Il convient donc de préciser, vis-à-vis du phénomène d'accumulation et de réduction du BM, la part revenant à chacune de ces lignées, et de rechercher d'éventuelles interactions entre ces différents types cellulaires.

Il apparaît en premier lieu, que les leucocytes n'ont aucune action dans ce phénomène. Une suspension de leucocytes (à la concentration physiologique), débarrassée des globules rouges ne réduit pas et n'accumule pas le bleu de méthylène. L'addition à cette suspension de 0,1 ml de sang total* ne modifie pas ce résultat.

Il semble donc clair que seule la population d'érythrocytes est concernée par le phénomène d'accumulation – réduction du BM. Toutefois, il importe de connaître le rôle joué par les érythrocytes de différents âges dans ce phénomène et de préciser si des interactions cellulaires sont possibles.

Nous avons déjà mentionné que pour des concentrations de sang 5 fois plus faibles, l'accumulation du BM disparaît paradoxalement alors qu'il est possible de répéter plus de 5 fois l'incubation (aux concentrations habituelles) sur une même quantité de sang. Nous en avions déduit que des interactions cellulaires étaient possibles et que celles-ci supposaient une certaine contiguïté réalisée par une concentration suffisante de sang.

La Figure 53 nous montre la variation de la perméabilité au BM (appréciée par le Δ_{10}) en fonction de la concentration de sang (courbe en trait continu). La courbe en trait discontinu a été obtenue en réalisant la même gamme de concentrations mais tous les incubats recevaient en plus de la quantité de sang normal figurée en abscisse, 0,2 ml de sang provenant d'un sujet totalement déficient en G6PD et nous savons qu'un tel sang est incapable d'accumuler le BM.

Les résultats d'activité au niveau de cette suspension mixte sont représentés (Figure 53), par la courbe en trait discontinu : on constate, pour les faibles concentrations de sang, un «effet stimulant» du sang déficient vis-à-vis du sang normal. Il apparaît que ces interactions cellulaires, pour de faibles concentrations, sont de nature non spécifique, puisqu'un effet stimulant peut être observé en utilisant des érythrocytes dont la voie des pentoses est inopérante et qui n'accumulent pas le BM.

On peut en outre remarquer qu'au voisinage des concentrations normalement utilisées dans le test (0,4 à 0,6 ml de sang), l'addition de sang déficient en G6PD ne modifie pas le Δ_{10}. Le test au BM peut donc dans ces conditions, être retenu comme un moyen de caractérisation des sujets hétérozygotes pour le déficit en G6PD : des deux populations d'érythrocytes présentes – inactive et active – seule la dernière accumule le BM.

** Nous avons déjà mentionné que pour cette concentration, on n'observe aucune accumulation de colorant.*

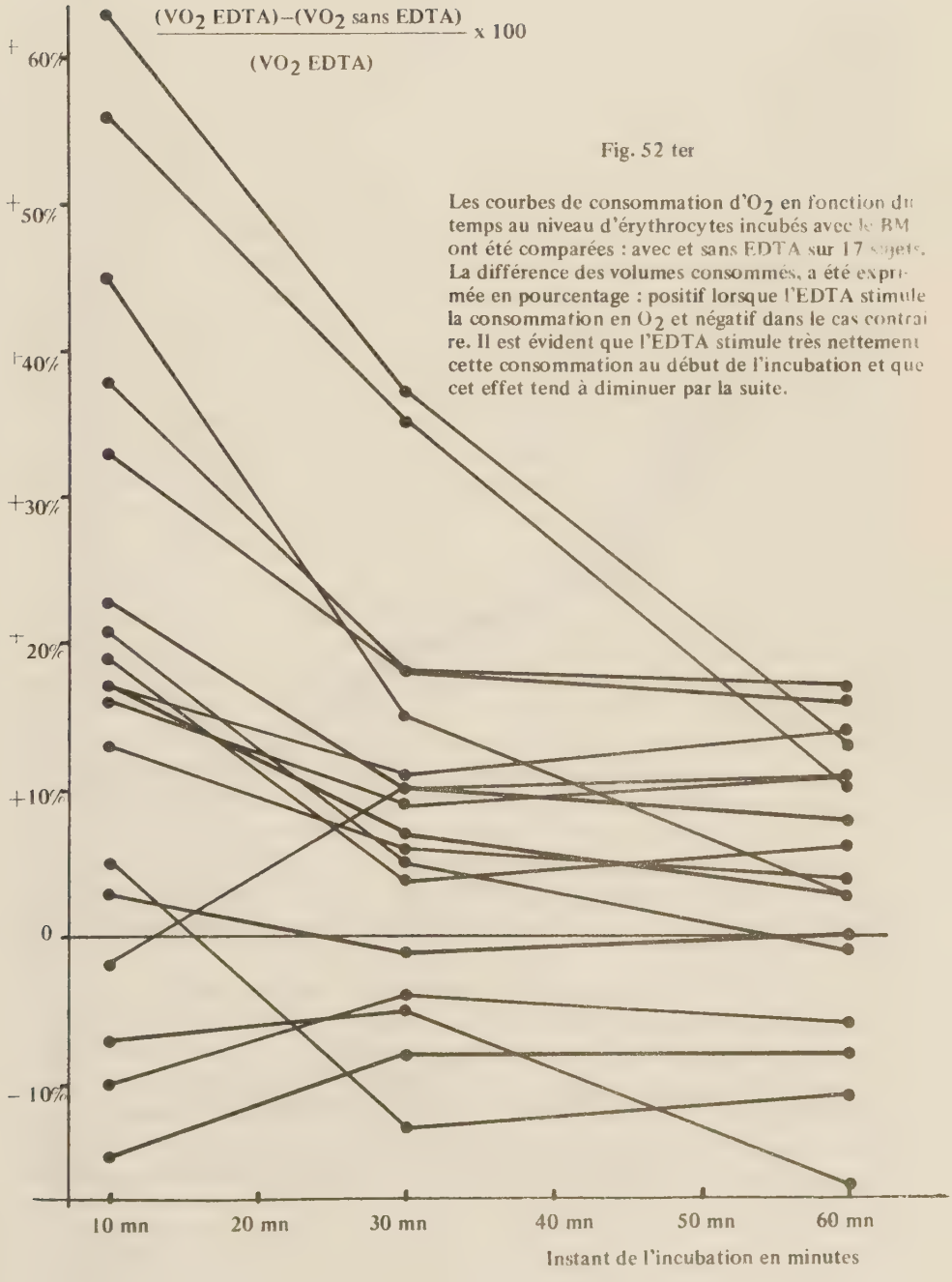


Fig. 52 ter

Les courbes de consommation d'O_2 en fonction du temps au niveau d'érythrocytes incubés avec le BM ont été comparées : avec et sans EDTA sur 17 sujets. La différence des volumes consommés, a été exprimée en pourcentage : positif lorsque l'EDTA stimule la consommation en O_2 et négatif dans le cas contraire. Il est évident que l'EDTA stimule très nettement cette consommation au début de l'incubation et que cet effet tend à diminuer par la suite.

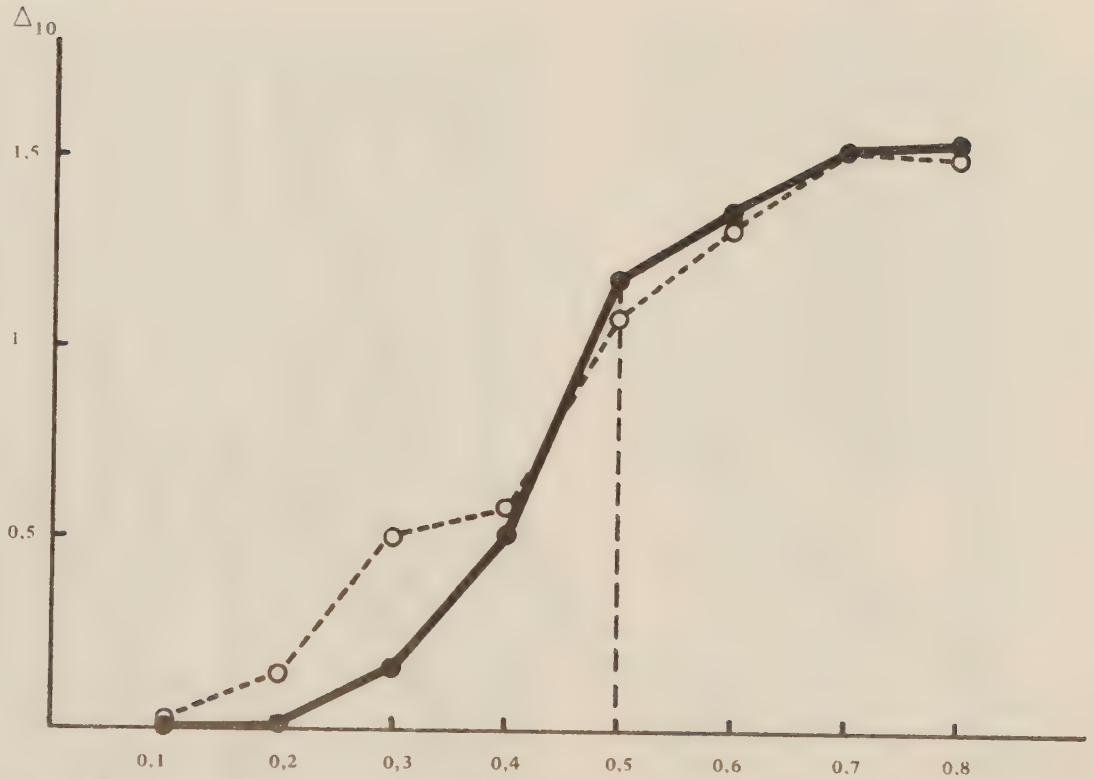


FIGURE 53 – Le test du BM a été réalisé, pour une même concentration de bleu et un volume total constant, avec différentes concentrations de sang. L'activité a été exprimée en Δ_{10}. La courbe en trait continu représente la relation entre le Δ_{10} et la concentration de sang. La courbe en trait discontinu a été obtenue en répétant le même protocole, chaque incubat recevant en outre 0,20 ml de sang provenant d'un sujet totalement déficient en G6PD.

Donc l'étude de l'accumulation de BM par le sang total, n'implique que les erythrocytes à l'exclusion d'autres cellules, sans qu'il soit possible de préciser la part relative qui revient à telle ou telle tranche d'âge de cette population. Néanmoins, nous avons vu que des interactions cellulaires existent et nous les avons qualifiées de non spécifique, car elles sont possibles à partir d'érythrocytes dont la voie des pentoses est inopérante vis-à-vis de faibles concentrations d'érythrocytes normaux.

Nous avons déjà dit que l'érythrocyte qui a accumulé du BM est capable d'une activité réductrice vis-à-vis du milieu extracellulaire et même d'autres érythrocytes.

D'après les travaux de KAPLAN et BEUTLER (51, 53), du leuco-BM pourrait diffuser hors de l'érythrocyte et réduire de la méthémoglobine en solution ou au niveau d'érythrocytes déficients en G6PD. Lorsque l'on se trouve en présence d'une double population : normale et déficiente, on conçoit qu'il existe une cause d'erreur car il n'y a pas additivité simple des effets séparés et la courbe de réduction de la méthémoglobine* peut sous-estimer le pourcentage de cellules déficientes.

Nous avons étudié ce type particulier d'interactions des érythrocytes chargés de leuco-BM vis-à-vis du milieu extracellulaire contenant de la méthémoglobine en solution. Dans ces conditions, on constate une réduction du pigment et la rapidité avec laquelle elle s'effectue dépend de la concentration d'érythrocytes présents et pour un nombre de cellules donné de la quantité de colorant ayant été fixé au préalable au niveau des érythrocytes.

Une étude microscopique des érythrocytes mis en présence de BM a été réalisée par OSKI (152). Cet auteur constate après 3 heures d'incubation, l'existence de 10 à 15 % de cellules plus colorées : ce phénomène disparaissant chez le sujet déficient en G6PD.

A notre tour, nous avons suivi l'aspect microscopique de tels incubats. Durant la phase d'accumulation et de réduction du colorant, on constate une tendance à la sphérocytose. Après une heure, la totalité se trouve sous forme de sphérocytes, la majorité émettant des digitations donnant des images en «épines d'oursins».

Il existe en outre des prolongements plus longs, atteignant parfois 15 μ plus ramifiés et visibles uniquement sur les étalements secs, donc peu réfringents.

Après 3 heures d'incubation, ces modifications s'accentuent mais en outre 0,5 à 1 % des érythrocytes ont une nette coloration bleu. Ces dernières cellules se singularisent par la pauvreté des modifications membranaires : elles ont un aspect de sphérocyte lisse.

Au total, nous pouvons retenir l'existence intracellulaire de bleu de méthylène à l'état oxydé, après 3 heures d'incubation au niveau d'un très faible pourcentage de cellules, dont la nature – érythrocytes jeunes ou âgés, devrait être recherchée. La question se pose de savoir si la totalité du colorant ou une fraction seulement se trouve au niveau de ces cellules. L'absence d'images en «oursin» et de filaments dans ce cas, à l'opposé du reste de la population érythrocytaire, nous montre qu'il serait intéressant de préciser la nature des remaniements structuraux membranaires observés.

** Test de Brewer*

Durant cette réduction, il n'est pas possible de saisir une nette augmentation de BM oxydé dans le milieu extracellulaire. Mais on peut remarquer qu'une fois réoxydé au contact de la méthémoglobine, le BM pourrait à nouveau pénétrer à l'intérieur de l'érythrocyte. De plus, même en supposant que 4 moles de BMH_2 sont nécessaires pour réduire une mole de méthémoglobine et compte-tenu de la concentration de ce pigment dans nos incubats, il apparaît que des quantités infimes de BM sont nécessaires pour réaliser cette réduction qui, remarquons-le, se signe du point de vue spectral par une chute de D.O. (à 630 mμ) proche du maximum du BM et gêne l'appréciation des quantités de colorant présentes.

Nous avons pu établir que cette réduction ne faisait pas intervenir une fonction SH membranaire : le blocage de celle-ci par le parachloromercuribenzoate ne perturbe pas la cinétique de réduction.

L'effet de l'addition d'EDTA (Na_2) est difficile à interpréter : il semble avoir une légère action en faveur d'une réduction plus rapide.

L'étude de la consommation d'oxygène au niveau d'érythrocytes ayant fixé du BM et mis en présence d'une solution de méthémoglobine ne modifie pas la courbe de consommation en oxygène. Ces faits peuvent permettre de soupçonner que la méthémoglobine en solution extracellulaire ne stimule pas, au travers de la membrane, les processus de réoxydation du leuco-BM érythrocytaire. La question qui se pose en effet, est de savoir si la présence de méthémoglobine extracellulaire est capable de modifier le mouvement transmembranaire du colorant ou si la sortie passive du leuco-BM «profite» à un accepteur adéquat : ici la méthémoglobine.

Au total, l'action réductrice extracellulaire d'érythrocytes ayant accumulé du bleu de méthylène est liée probablement à la sortie passive du leuco-dérivé. Les travaux de BEUTLER et KAPLAN ont montré que cette action réductrice pouvait s'étendre non seulement au milieu environnant, mais aussi au niveau d'autres érythrocytes méthémoglobinisés et déficients en G6PD.

Il convient de remarquer que de tels phénomènes n'ont jamais été observés lorsque le système de la $NADH_2$ diaphorase est seul impliqué. Dans ce cas, l'étude de la réduction de la méthémoglobine en l'absence de BM au niveau d'une double population (artificielle) normale et déficiente en $NADH_2$ diaphorase ne montre jamais d'interaction et il y a toujours additivité simple (100).

Néanmoins, nous avons recherché si le milieu extracellulaire provenant d'érythrocytes incubés avec du BM était doué d'une activité réductrice. La recherche de glutathion réduit dans ce milieu est négative. Il n'existe, au niveau du surnageant, aucune action réductrice directe de la méthémoglobine ou en présence de pyridines nucléotides oxydés.

En utilisant un autre type d'accepteur : phénazine et MTT*, on n'observe jamais la précipitation de formazan. Il n'y a donc pas diffusion hors de l'érythrocyte, d'un composé doué d'une activité réductrice et stable en aérobiose. Cette dernière remarque nous permet de rappeler que le leuco-BM est spontanément très auto-oxydable et qu'il est vain de chercher à caractériser cette forme, par étude du spectre U.V. du surnageant. Il semble probable que la réduction observée nécessite la présence aux abords immédiats de la membrane de la méthémoglobine . le leuco-BM ayant vis-à-

* *test de Brewer*

vis de cet accepteur, une affinité bien plus grande que pour l'oxygène. BEUTLER notait d'ailleurs que l'oxygénation (par agitation) des suspensions, n'altérait en rien la cinétique de réduction au niveau des populations mixtes d'érythrocytes (53).

Nous venons d'envisager quelques interactions érythrocytaires en considérant l'accumulation du BM d'une part et d'autre part l'activité réductrice extracellulaire de telles suspensions vis-à-vis de la méthémoglobine en solution.

Pour être complet, nous avons recherché si des interactions pouvaient être mises en évidence lorsque l'on mesure la consommation d'oxygène, en présence de BM au niveau d'une population mixte artificiellement constituée : normale et totalement déficiente en G6PD. Les mesures nous ont montré qu'il y a additivité simple des consommations mesurées séparément, lorsque l'on mélange ces deux populations dans une même fiole. Il n'y a donc pas d'interactions cellulaires dans ce cas.

5 - CONCLUSION -

En conclusion, l'érythrocyte mis en présence de bleu de méthylène peut :

- l'accumuler et le réduire
- augmenter sa consommation d'oxygène
- ou éventuellement réduire de la méthémoglobine

Si ces trois situations ont pour point commun la fourniture en triphosphopyridines nucléotides réduits, nous pouvons conclure qu'elles ne sont pas totalement identiques au niveau de l'érythrocyte normal ou porteur de tares enzymatiques.

L'accumulation se présente comme le phénomène le plus sensible aux conditions environnantes auquel il faut ajouter que la présence en enzymes réducteurs indispensables ne représente pas le point fondamental unique. En effet, on doit obligatoirement associer une avidité «initiale»de la membrane pour le colorant. Nous avons précisé dans quelles conditions celle-ci se présentait. La possibilité d'accumulation à la température de 2°C pose le problème d'une dissociation éventuelle entre les phénomènes d'accumulation et de réduction qu'il faudrait vérifier.

Par ailleurs, les études spectrophotométriques de la phase initiale de l'incubation dans les conditions normales, permettent de supposer une liaison entre le colorant et un composé inconnu de la membrane. Le fait que ces mêmes modifications puissent être observées dans le milieu extracellulaire cette fois dans certaines conditions d'inhibition (par le cuivre et après lavage des hématies incubées à 2°C) pose dans ce cas le problème de la libération d'un composé membranaire modifiant les propriétés du BM en solution. Cette hypothèse gagnerait a être vérifiée. Quoiqu'il en soit, la rentrée du colorant et sa réduction par l'érythrocyte se présente comme un phénomène nécessitant une fourniture très minime en substrat et nous avons établi que les réserves intra-éry-

** MTT : 3 (4,5 Diméthyl Tiazolyl 1-2) 2,5 Diphényl Tétrazolium (Bromure).*

throcytaires suffisaient largement (lorsque le sang est prélevé sur milieu ACD).

A l'opposé, le maintien intracellulaire du BM nécessite la présence de glucose dans le milieu mais nous avons souligné que cette demande en substrat est avant tout fonction de la température et l'action de certains inhibiteurs comme le cyanure, est soumis aux mêmes conditions.

L'état du leuco-BM dans le globule rouge est encore une question sans réponse. Nous avons pu toutefois vérifier sur des érythrocytes intacts, l'absence de formation de méthémoglobine. On peut retenir avec SASS, que le leuco-bleu est soumis à deux ordres d'influences opposées : réductrice de la voie des pentoses et oxydante de l'oxygène et lorsqu'apparaît un déséquilibre en faveur de l'oxydation, le BM est exclu de la cellule. Toutefois ce phénomène n'est pas clair : les lignes qui précèdent semblent supposer que la réoxydation du colorant est antérieure à la sortie mais nous avons rappelé par ailleurs que l'activité réductrice extracellulaire de tels érythrocytes semble supposer la diffusion hors de la cellule de leuco-BM

De plus, les modifications métaboliques que nous avons observées gagneraient à être précisées : la nature exacte, physiologique ou lésionnelle, de la fraction supplémentaire de G6PD apparaissant sur les électrophorèses dans certaines conditions métaboliques reste à établir et des études sont en cours à ce sujet.

Au total, il ne semble pas y avoir une corrélation étroite entre les possibilités de réduction du BM par l'érythrocyte et son accumulation. En effet, nous avons pu vérifier chez certains sujets déficients en G6PD, l'existence d'une diminution assez faible de la consommation en oxygène par rapport aux sujets normaux. Mais il existe une impossibilité totale d'accumulation du BM. Il est donc paradoxal que les phénomènes d'accumulation ne soient pas en relation avec les phénomènes de réduction et SASS a souligné la nécessité de l'intégrité de la voie des pentoses.

Nous ajouterons que cette intégrité ne nous est pas apparue comme la seule condition de pénétration : les érythrocytes de certains sujets étant imperméables au colorant indépendamment d'une atteinte enzymatique. Nous allons donc étudier cet aspect en envisageant les résultats du test au BM chez des sujets normaux ou porteurs d'une affection morbide acquise ou congénitale.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE DE LA PERMEABILITE DU BM AU NIVEAU DES POPULATIONS DE SUJETS SAINS ET MALADES

Le test au BM a été pratiqué à partir de sang provenant d'une part de 80 sujets donneurs en bonne santé, et d'autre part de 92 malades porteurs d'une affection morbide acquise ou héréditaire et pour lesquels un bilan enzymatique sanguin avait été demandé.

Nous avons inclus dans la population des malades, des sujets non tarés mais apparentés à des sujets porteurs d'une anomalie héréditaire. Le sang recueilli sur ACD était testé au plus tard dans les 48 heures qui suivaient le prélèvement. Lorsque l'hématocrite – du fait de l'anémie – atteignait 20 %, la quantité de sang utilisée dans le test était doublée. La perméabilité était étudiée à l'aide de cinétiques réalisées sur la suspension à 660 mμ selon un protocole que nous avons déjà décrit (Cf p.63) et les résultats exprimés à l'aide de deux paramètres – le Tr et le Δ_{10} – déjà définis (Cf p 59).

Nous avons représenté (Fig. 54 a et b), l'histogramme de répartition. Dans ce cas, nous avons retenu le Tr comme paramètre d'activité. De plus, nous avons arbitrairement groupé les résultats en cinq catégories :

– LE GROUPE I : ou hyperactif, correspond à des Tr inférieurs à 12 minutes.

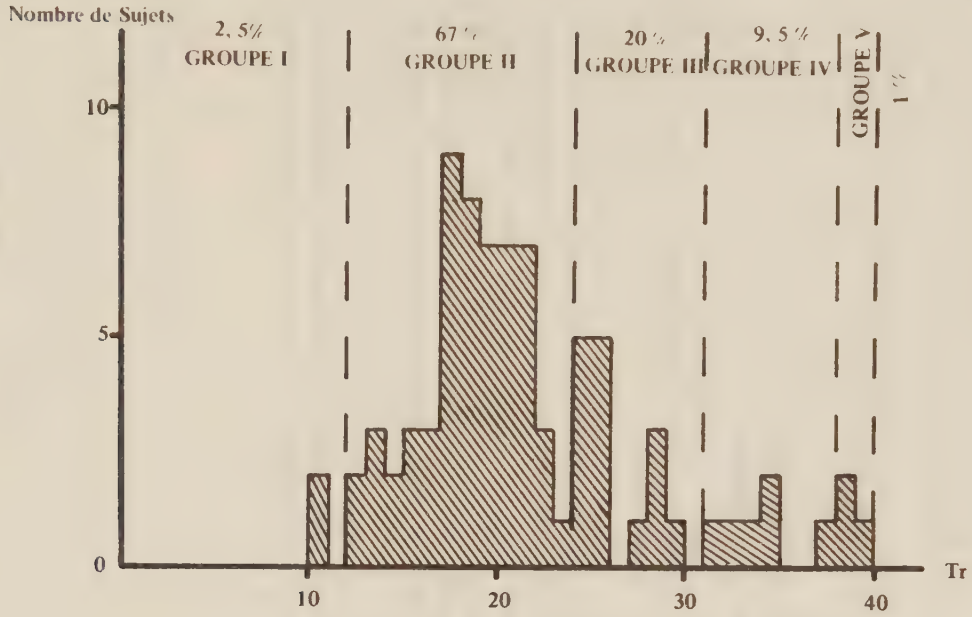
– LE GROUPE II : ou normal, comprend des sujets dont le Tr est supérieur ou égal à 13 minutes et inférieur à 25 minutes.

– LE GROUPE III : ou intermédiaire, dans lequel nous trouvons des sujets dont le Tr est supérieur ou égal à 25 minutes et inférieur à 32 minutes.

– LE GROUPE IV : définit des sujets franchement hypoactifs dont le Tr est supérieur ou égal à 32 minutes et inférieur à 39 minutes.

– LE GROUPE V : correspond à des sujets dont le Tr est supérieur à 39 minutes.

10 % des individus sains se rangent dans les groupes IV et V, alors que dans le même intervalle, nous trouvons 29 % des sujets malades : l'écart est donc nettement significatif.



POPULATION DE SUJETS SAINS (79 sujets)

Fig. 54 a

Histogramme de répartition de sujets sains et malades en fonction de leur capacité à accumuler et réduire le BM. Fig 54 a : étude de 79 sujets temoins.

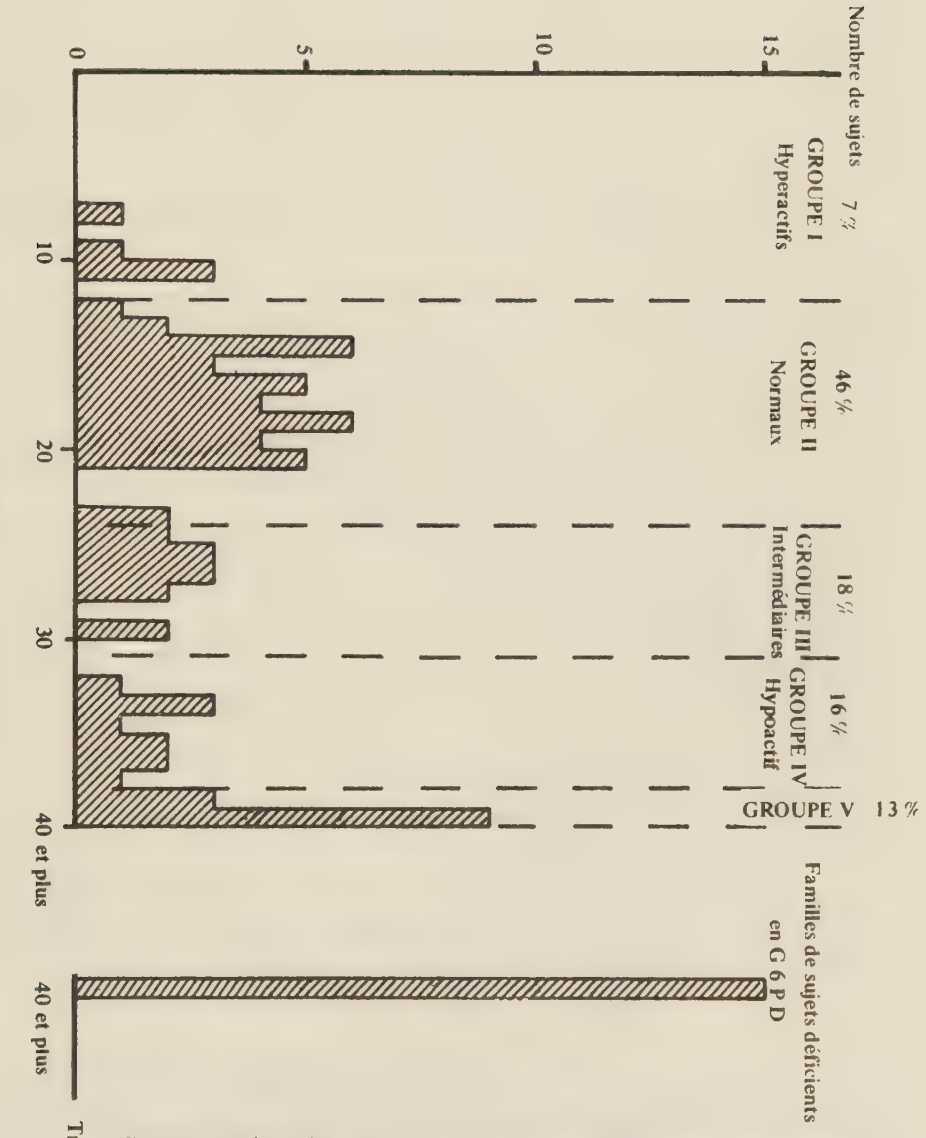


Fig 54 b

Histogramme établi à partir de sujets malades non déficients en G6PD. Nous avons placé à part les familles de sujets faviques, dont le T_r est $>$ 40 mn. Au total nous avons étudié 92 malades, les pourcentages indiqués dans ce cas, sont relatifs aux groupes de sujets non enzymopépiques.

Enfin, presque 90 % des sujets sains, mais seulement 71 % des malades se rangent dans les catégories I, II et III. Il est donc évident que la population de sujets malades se répartit en deux catégories, l'une présentant une distribution d'activité comparable, en première approximation à celle des sujets sains, l'autre franchement hypoactive.

Nous devons remarquer en outre que l'histogramme des malades (Fig. 54 b) a été établi à partir de sujets ayant un taux normal d'activité en G6PD – c'est-à-dire au moins égal à 200 U.I/g d'Hb – faisant ainsi apparaître que le niveau enzymatique n'est pas l'unique condition de pénétration du BM.

De plus, on peut se demander si l'existence au sein de la population de malade d'une plus grande proportion de sujets ayant une capacité accumulative du BM diminuée n'est pas imputable à l'anémie.

Nous avons déjà dit que nous opérions une correction «discontinue», en ce sens, que seuls les sangs ayant un hématocrite inférieur ou égal à 20 %, étaient testés avec une double concentration. En fait, il n'en est rien et les sujets malades appartenant aux groupes IV et V de la figure 54 b ne présentent pas une proportion plus élevée de sujets ayant un hématocrite intermédiaire, c'est-à-dire compris entre 20 et 40 % qui puisse expliquer l'importance de ce groupe chez les malades et ce, nous le rappelons, indépendamment du déficit en G6PD.

Enfin on peut noter que le groupe III (ou groupe intermédiaire), contient la même proportion de sujets qu'ils soient malades ou sains (18 % contre 20 %).

Il convient maintenant d'examiner ces résultats corrélativement avec le niveau d'activité de la G6PD. Nous avons représenté cette relation au niveau de la Fig. 55. Dans ce cas, soulignons que nous n'avons étudié que les sujets malades et que ce graphique comprend aussi bien les sujets ayant un taux normal de G6PD que des sujets porteurs du déficit héréditaire. Les pourcentages établis dans ce dernier cas ne doivent pas être confondus avec ceux que nous avons portés au niveau des histogrammes de la Fig. 54 b dans laquelle les sujets enzymopéniques étaient exclus.

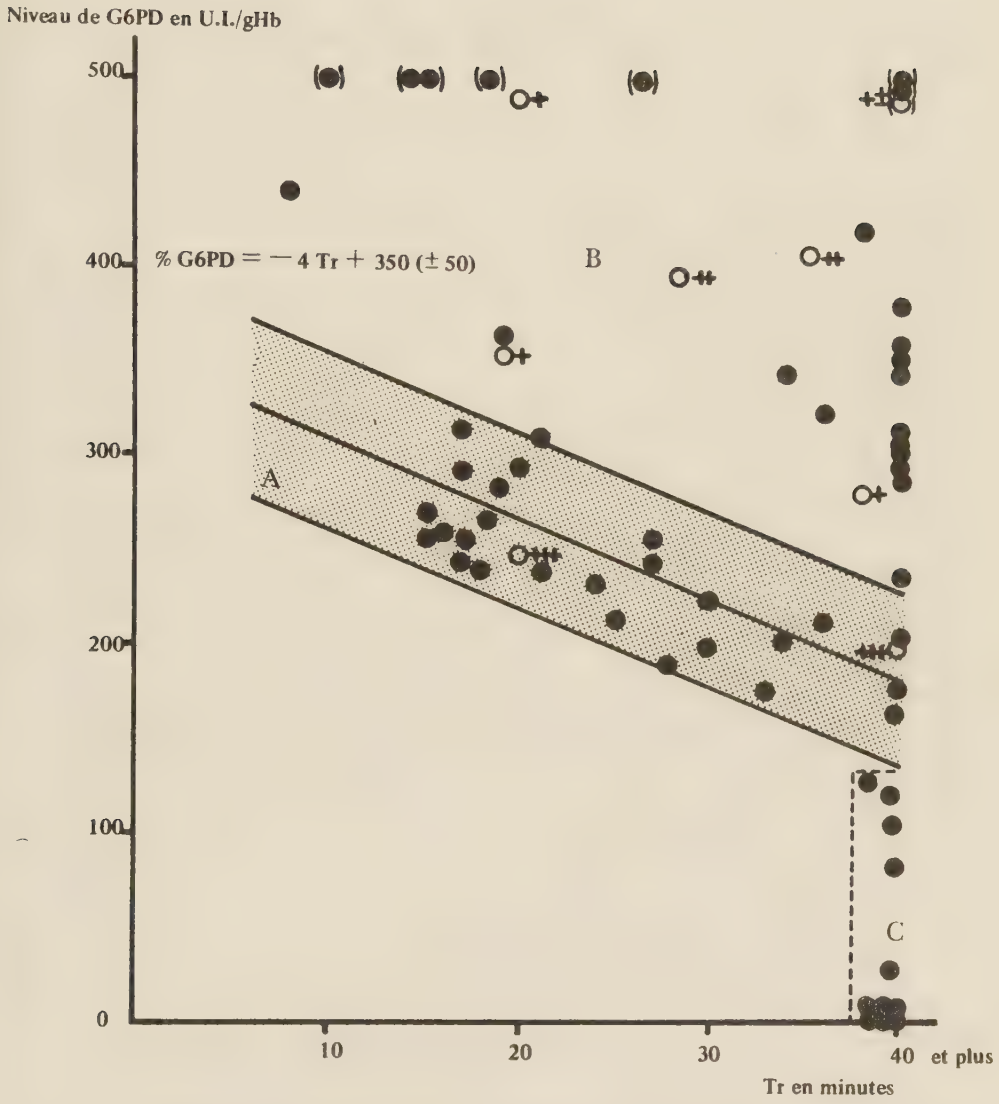
La répartition des différents sujets au niveau de la Fig. 55 semble se faire dans trois régions qui s'individualisent assez facilement.

1) La région A groupe 42 % des points et il semble exister une relation grossièrement linéaire avec le Tr. On peut résoudre graphiquement une relation de dépendance entre les deux paramètres telle que :

$$E = -4\,Tr + 350\,(\pm 50)$$

avec Tr en minute et E : Activité de la G6PD en U.I par gramme d'hémoglobine.

Il apparaîtrait alors que pour 42 % des malades : les phénomènes de perméabilité au bleu puisse être expliqué par la fluctuation normale du taux de G6PD avec lequel ils semblent étroitement liés. En effet, d'après l'équation énoncée ci-dessus, une chute d'activité enzymatique de 10 % entraîne une perte de Tr de 40 %. Enfin, on peut regretter de ne pas avoir établi les mêmes séries de dosages enzymatiques au niveau de la population de sujets sains, il nous manque donc un élément de comparaison.



Corrélation entre le niveau d'activité de la G6PD et l'activité des érythrocytes à accumuler et réduire le bleu de méthylène. Etude concernant une population de malades ayant une activité normale élevée ou très abaissée en G6PD. Les sujets (●) sont hyperactifs en G6PD : leurs valeurs s'échelonnant entre 500 et 800 ui/gHG. Nous avons isolé les sujets présentant une dégradation de substance H : ○ ; nous avons indiqué, à côté l'intensité de la dégradation très faible + ; moyenne + ± importante ± et totale + ++. La répartition des sujets est la suivante : 42 % dans la Région A ; 42 % dans la région B et 16 % dans la région C.

Fig. 55

2) La Région B correspond au nuage de points situés au-dessus du précédent et groupe 42 % des sujets dont le niveau d'activité en G6PD est compris dans presque tous les cas au-dessus de la limite supérieure de la normalité.

3) La Région C : Elle caractérise des individus faviques dont les érythrocytes ont un niveau très bas ou nul de G6PD.

Nous avons poursuivi cette recherche de corrélations entre le niveau d'activité enzymatique et la capacité d'accumulation et de réduction du BM.

Dans ce but, nous avons successivement étudié cette relation avec le niveau de 6-phospho-gluconate-déshydrogénase (Cf. Fig. 56), la glutathion réductase, la pyruvate kinase, la lactico déshydrogénase. Ces résultats ne font apparaître aucune corrélation évidente. Les mêmes conclusions sont applicables à l'étude corrélative du taux de glutathion réduit et du Tr (Cf. Fig. 57).

Au total, il est permis d'affirmer que l'hypoactivité observée chez certains sujets, lors du test au BM, semble pouvoir s'expliquer à partir des variations du taux de G6PD à l'intérieur de l'intervalle de normalité (dans 42 % des cas).

Indépendamment du caractère obligatoire de la non accumulation du colorant par les hématies de sujets porteurs du déficit héréditaire en G6PD (16 % des cas).

Remarquons que 42 % des sujets ayant un niveau d'activité enzymatique élevé, se rangent parmi toutes les classes d'activités du Tr.

Enfin il est intéressant de noter l'indépendance de ces phénomènes d'accumulation vis-à-vis du taux de glutathion réduit ou de glutathion réductase.

Nous poursuivrons l'étude de ces résultats en envisageant les caractères de la perméabilité érythrocytaire du BM dans différentes entités morbides. Notre intention sera moins de généraliser que de tenter de dissocier le groupe de malades présentant une hypoactivité avec ce test.

Nous analyserons successivement le cas :

1) des enzymopathies
2) des anomalies de l'hémoglobine
3) des variations antigéniques érythrocytaires
4) des affections malignes
5) des sujets présentant une dysthyroïdie
6) de quelques sujets insuffisants respiratoires chroniques

1) Les Enzymopathies Héréditaires

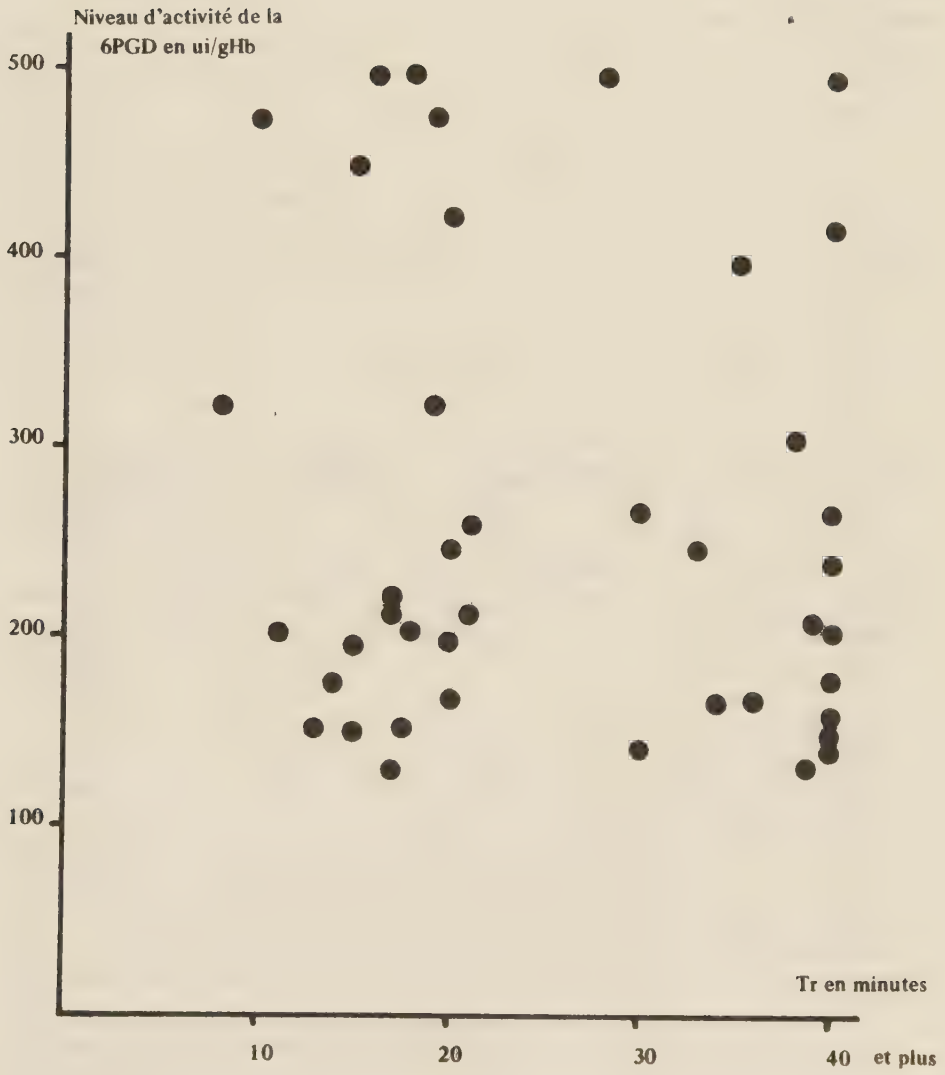
Nous en avons étudié deux types :

– Les déficits en pyruvate kinase
– Les déficits en G6PD

A – Le déficit en G6PD –

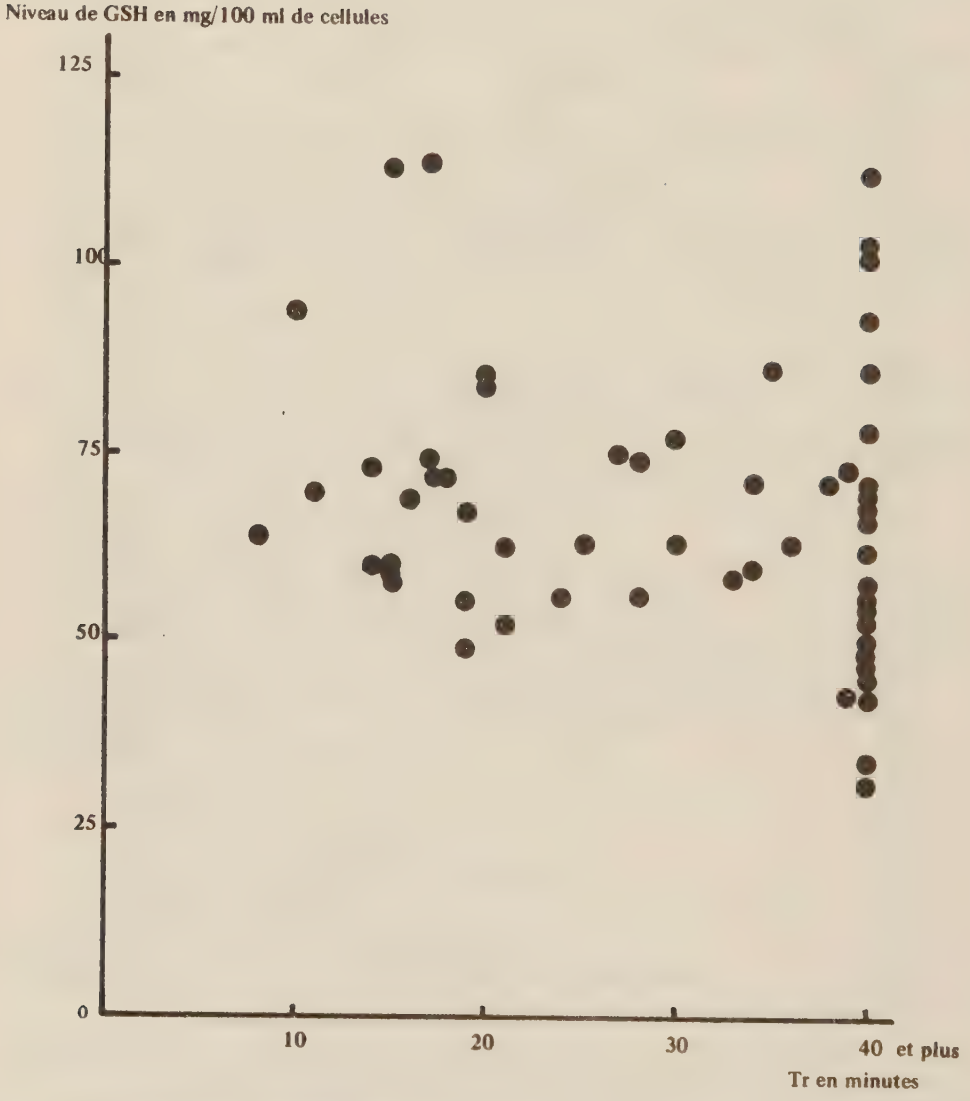
Les rapports entre l'érythrocyte déficient et le BM, ont été abordés de diverses manières.

La position de la question est la suivante : Le BM est incapable de stimuler la voie des pentoses de tels sujets, et comme l'a établi SASS, l'érythrocyte est dans ce cas



Il n'existe pas de relation entre le niveau d'activité de la 6 phospho gluconate deshydrogénase (6PGD) et le Tr.

Fig. 56



Il n'existe pas de corrélation entre le Tr et le taux de glutathion réduit (GSH)

Fig. 57

imperméable au colorant. Lorsque nous avons étudié la consommation en O_2 (Cf p.82), nous avons remarqué que celle-ci était diminuée de manière très variable chez les sujets totalement déficients en enzyme, mais nous avons noté que cette consommation d'oxygène était d'autant plus basse que le quotient respiratoire était élevé (Cf. Fig. 41).

Nous avons enfin remarqué que la présence d'une consommation en oxygène résiduelle non négligeable permettait d'affirmer l'existence d'une capacité réductrice, provenant de la voie des trioses, celle-ci s'avérant inopérante – soit vis-à-vis de la pénétration du BM (qui une fois réduit doit être immédiatement explusé) – soit vis-à-vis de la réduction de la méthémoglobine.

Lorsqu'on réalise une double population artificielle d'érythrocytes normaux et déficients, nous avons déjà mentionné qu'il est possible, en présence du colorant d'observer des interactions vis-à-vis de la réduction de la méthémoglobine (51, 53) ou vis-à-vis de l'accumulation du colorant (Cf. fig.53).

Nous allons envisager maintenant la perméabilité et la réduction du BM au niveau d'érythrocytes porteurs du déficit partiel ou total en G6PD et le problème de l'hémolyse dans ce cas.

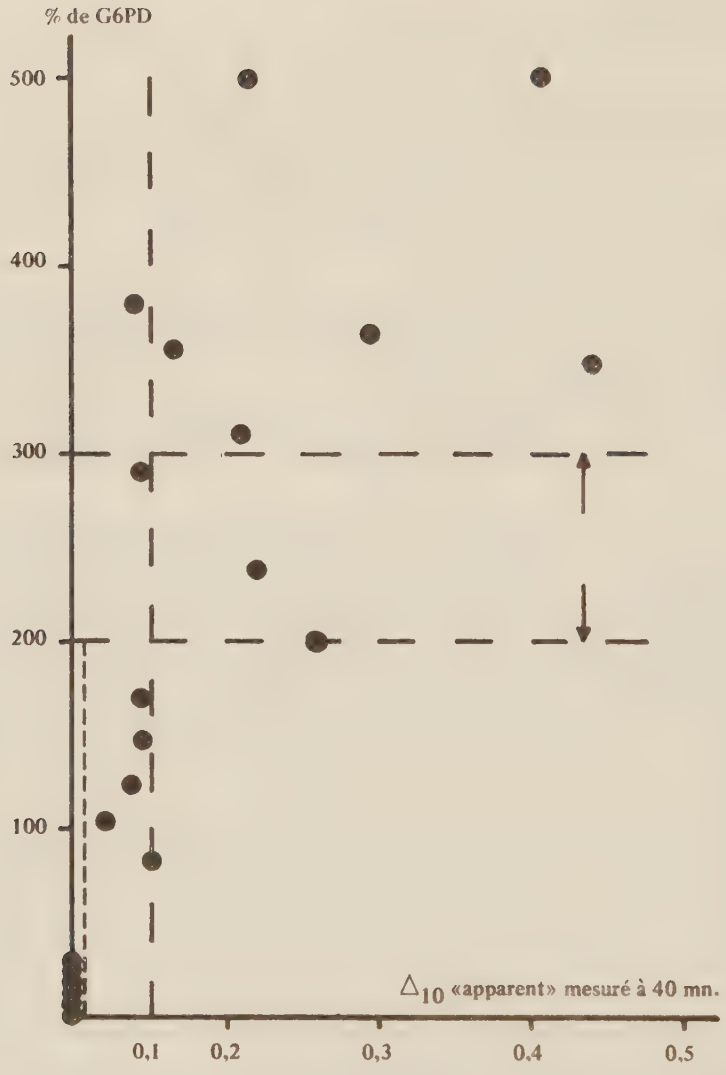
La Perméabilité - Selon SASS, le bleu de méthylène ne pénètre pas dans l'érythrocyte déficient en enzyme. Nous avons pu vérifier au niveau d'érythrocytes totalement enzymoprives que la phase de fixation initiale du colorant était abolie et que l'enregistrement réalisé sur de telles suspensions montrait l'absence de réduction du colorant au bout de 40 minutes. Toutefois, la poursuite de l'enregistrement durant 3 heures fait apparaître une légère réduction. Si l'on étudie le surnageant, on constate que le BM se fixe au niveau de l'érythrocyte, avant que tout phénomène de réduction n'ait commencé. L'addition au milieu de purines nucléosides ne modifie pas ces résultats.

Au total, nous retiendrons que le sujet atteint de déficit profond présente lors du test au BM, un Tr supérieur à 40 minutes, mais nous avons vu (Cf. Fig. 54), que de nombreux sujets ont une valeur identique indépendamment d'un défaut en G6PD. On doit toutefois remarquer que le Tr représente un critère impropre, il faut dans ce cas le remplacer par le «$\triangle_{10}$ apparent», c'est-à-dire la pente (chute de D.O. en 10 minutes à 660 mμ) de la courbe, à la quarantième minute d'incubation.

La Figure 58 nous montre une assez bonne séparation pour un $\triangle_{10}$ apparent inférieur à 0,1 on note que 11 sujets sur 13 sont porteurs du déficit complet ou partiel en G6PD. Parmi les non déficients, on note deux sujets appartenant à une famille favique mais possédant un niveau normal d'activité enzymatique.

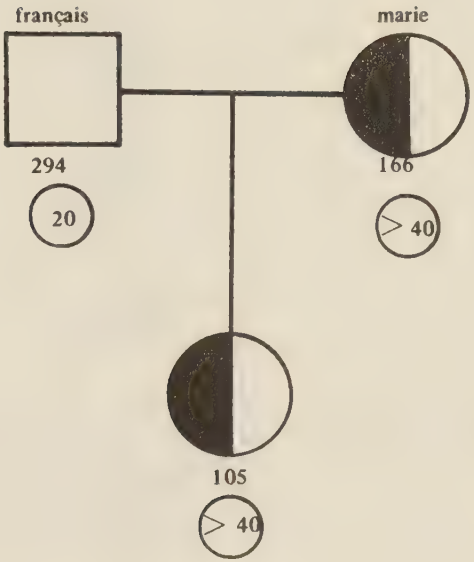
A l'aide de deux exemples, nous allons envisager le test au BM dans l'étude des familles de sujets déficients en enzyme.

La famille B... nous montre une bonne corrélation entre l'allongement du Tr et la chute du niveau de G6PD chez la mère (Marie B...) et la fille (Hélène B...), toutes deux hétérozygotes tandis que le père est normal (Fig. 59). Un dosage enzymatique érythrocytaire avait été demandé ici par le médecin traitant, dans le but de rechercher une éventuelle tare héréditaire : un enfant étant décédé brutalement sans qu'aucune étiologie précise n'ait pu être avancée.



Nous avons essayé de dissocier le groupe de sujets présentant un $Tr_{-} \geqslant 40$ minutes et nous les avons porté sur le graphique en fonction de l'activité en G6PD et du Δ_{10} apparent (voir le texte). On constate que les sujets dont le Δ_{10} apparent est inférieur ou égal à 0,1 ont un déficit en G6PD hormis 2 sujets dont l'activité enzymatique est normale mais qui, remarquons le, appartiennent à une famille de sujets faviques. Chez les sujets hétérozygotes ayant une activité intermédiaire en G6PD, on constate la persistance d'une faible activité résiduelle avec le BM. Les sujets totalement déficients ont un Δ 10 apparent nul.

Fig. 58



Étude de la famille B..., les symboles utilisés sont définis au niveau de la fig. 60

Fig. 59

Le deuxième exemple (Fig. 60) concerne une famille atteinte de favisme et d'origine Sarde. La mère présente un déficit complet et le père est normal. Les enfants de sexe masculin présentent un taux nul de G6PD, comme on pouvait s'y attendre. Les filles dans ce cas sont hétérozygotes obligatoires avec un niveau d'activité enzymatique qui – à priori – peut être variable mais qui est ici normal.

On peut s'étonner alors que la totalité de ces sujets soient incapables d'accumuler et de réduire le BM (Tr en général supérieur à 40 minutes). Ce fait est d'interprétation malaisée. En effet, nous avons vu (Fig. 54) qu'indépendamment d'un défaut en G6PD au sein de la population de sujets sains et surtout de malades existait une proportion notable de sujets ayant un Tr aussi allongé. Il serait donc abusif pour l'instant, de rapporter l'allongement du Tr chez les sujets hétérozygotes à un facteur propre au favisme transmis indépendamment du défaut en G6PD. Par ailleurs on note chez certains membres de cette famille une microcytose très importante.

L'Hémolyse

Nous avons recherché par ailleurs si l'incubation avec du BM de tels érythrocytes enzymopéniques n'entraînait pas une hémolyse. Il est possible dans quelques cas, après une incubation de 48 heures avec le colorant et du glucose, d'observer une hémolyse. Dans un cas de déficit complet elle était notable et aggravée par l'addition de lactate. Dans tous les autres cas, elle était très minime et une appréciation quantitative est difficile du fait de la présence du colorant.

B – Le déficit en Pyruvate-Kinase –

Quatre sujets, hétérozygotes pour le déficit en pyruvate-kinase, ont été étudiés. Chez aucun d'entre eux nous n'avons relevé d'anomalies de la perméabilité au colorant. Nous avons antérieurement fait les mêmes remarques concernant les mesures de la consommation en O_2 ou du quotient respiratoire en présence du colorant.

2) Les Anomalies de l'Hémoglobine

Nous avons appliqué le test au BM dans deux circonstances :

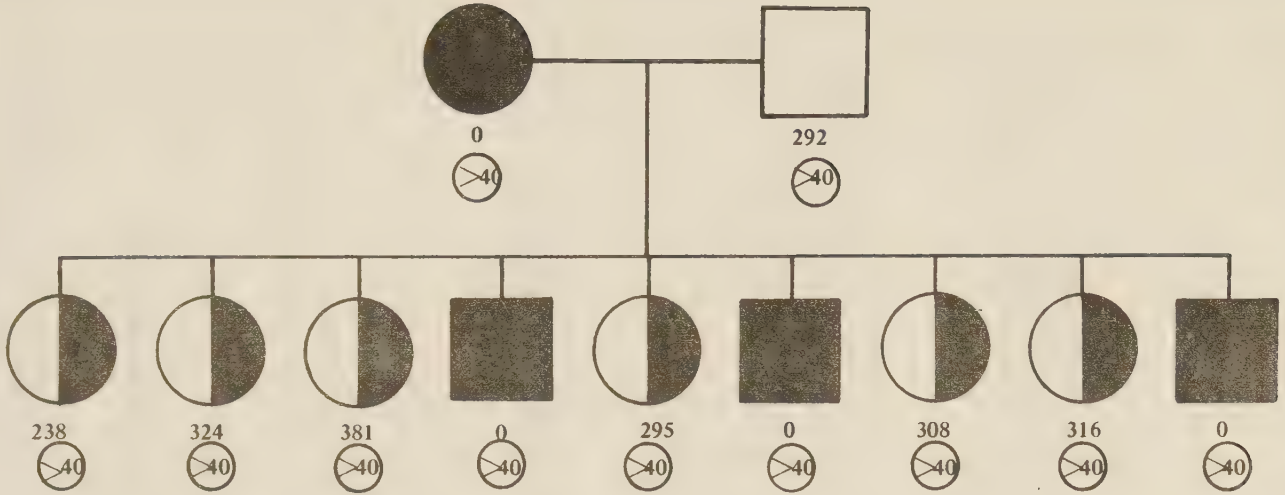
– Les méthémoglobinémies acquises de l'enfant

– Dans l'hémoglobinose I^{Toulouse}

Les Méthémoglobinémies acquises – SASS avait montré l'imperméabilité relative vis-à-vis du BM de l'érythrocyte artificiellement méthémoglobinisé.

Nous avons pu suivre l'évolution de quatre cas de méthémoglobinémie acquise chez le nourrisson. Il apparaît que le test au BM est un moyen impropre de détection, car jusqu'à 20 % de méthémoglobine, les érythrocytes de ces sujets présentent un Tr normal, c'est-à-dire inférieur à 24 minutes. Le Tr était supérieur à 40 minutes dans un cas où nous avons trouvé un taux de méthémoglobine égal à 58 %.

L'Hémoglobinose I^{Toulouse} – Cette hémoglobinose, récemment décrite (182), a été mise en évidence chez un seul sujet Jean I..., les sept autres membres étudiés de cette famille étant normaux. La tare a été caractérisée et porte sur une substitution $\beta 66$ lys → glu et entraîne des modifications dans l'affinité de l'hème pour l'oxygène.



○ sujet ♂

● sujet ♀

◑ sujet totalement déficient

□ Hétérozygote

Étude du Test au BM dans une famille de sujets faviques (famille SP...). L'activité de la G6PD est indiquée au-dessous de chaque sujets. Le nombre cerclé indique le Tr en minute.

Fig. 60

Le sujet Jean I... présente un Tr augmenté (36 minutes), mais il est difficile de rapporter ce fait à l'hémoglobinose elle-même, car d'une part il n'existe aucun autre cas d'anomalie moléculaire dans cette famille, et d'autre part chez un neveu du propositus nous avons trouvé un Tr de 39 minutes.

3) Etude de la perméabilité au BM dans quelques variations antigéniques érythrocytaires

Deux points nous ont retenus : le groupe Ax et les dégradations de substance H.

Le Groupe Ax est un phénotype rare parmi les autres sous-groupes de A. Nous avons pratiqué le test au BM sur une famille dont les sujets étaient O ou Ax. Sur les 5 cas étudiés, il y avait un allongement du Tr coïncidant avec le phénotype Ax (Tr $>$ 30 minutes) ; les sujets du groupe O avaient un Tr normal (inférieur à 24 minutes) Fig. 61.

Les dégradations de substances H

Nous avons étudié 7 cas de dégradation. Il n'existe aucune corrélation apparente entre les variations du Tr et l'intensité de la dégradation. Toutefois certains individus présentent une élévation au-dessus de la normale de l'activité en G6PD. Ce fait nous a conduits à étudier la position de ces sujets sur un graphique où ces deux paramètres étaient figurés (Cf. Fig. 55).

Nous voyons que deux sujets présentant une dégradation totale de substance H se situent dans la région A, que nous avons déjà définie.

Par contre, toutes les dégradations partielles : faibles ou moyennes appartiennent à la région B (5 cas).

Au total, la recherche de corrélation entre une variation antigénique membranaire et la perméabilité au BM reste à confirmer et des études dans ce sens sont en cours à l'heure actuelle.

4) Les affections malignes

Trop peu de sujets ont été examinés ; toutefois nous avons trouvé un Tr :

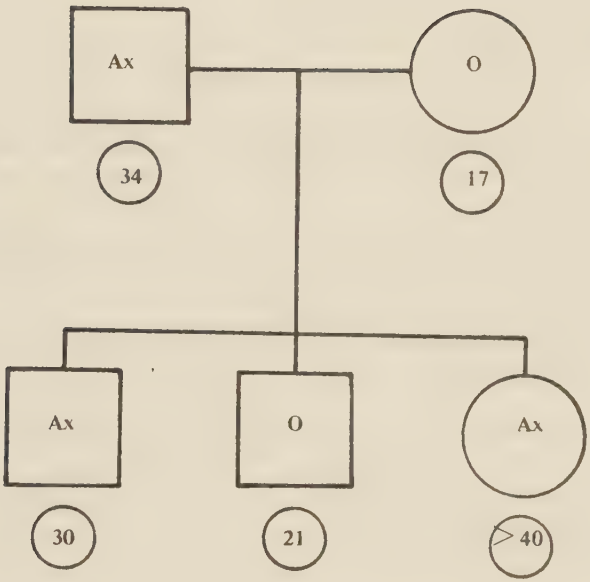
- normal dans 3 cas de maladie de Hodgkin
- allongé (supérieur à 40 minutes) dans deux cas de néoplasie viscérale
- normal dans une leucémie myéloïde chronique et allongé dans une leucose aiguë.

Mais ces observations sont trop isolées pour que l'on puisse tirer quelques conclusions.

5) Les sujets présentant un dysfonctionnement thyroïdien

Hyperthyroïdie

Depuis les travaux de PEARSON et Coll. en 1961 (184), on sait que les hyperthyroïdiens présentent un taux de G6PD très élevé, selon un mécanisme probablement activateur de la thyroxine sur la régulation de la synthèse enzymatique.



Etude corrélative du phénotype Ax et O et de la perméabilité au BM , le Tr exprimé en minutes a été figuré audessous de chaque sujets (famille SA...)

Fig. 61

Dans deux cas d'hyperthyroïdie (confirmée par l'étude isotopique), nous avons trouvé un Tr très allongé (supérieur à 40 minutes), bien que l'activité enzymatique soit supérieure à 300 U.I chez ces sujets. A l'opposé, chez 3 malades présentant une dystonie neurovégétative, sans participation thyroïdienne, le Tr était situé dans l'intervalle normal (inférieur à 24 minutes).

Hypothyroïdie

– Dans un cas d'hypothyroïdie fruste de l'adulte, nous avons trouvé un Tr normal

– A l'opposé, l'étude d'un enfant présentant un myxoedème congénital avec anémie nous a montré un Tr très allongé (supérieur à 40 minutes) ; le taux de G6PD étant normal.

Au total, on peut retenir que si la thyroxine a pour effet d'augmenter le niveau d'activité de la G6PD, les capacités de réduction du colorant suivent une évolution inverse.

Enfin, la mauvaise accumulation dans un cas d'athyréose congénitale semblerait confirmer l'action «trophique» de la thyroxine vis-à-vis de l'hématopoïèse.

6) Etude de quelques sujets en état d'insuffisance respiratoire chronique

On sait que la désaturation du sang entraîne la mise en jeu, dans quelques cas, d'un mécanisme compensateur : l'augmentation du niveau de 2-3 diphosphoglycérate et conséquemment, des modifications de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. Nous n'avons trouvé aucune variation et les quatre malades examinés présentent un Tr normal.

CONCLUSION

Nous ne pouvons formuler qu'une conclusion partielle : ces résultats ne représentant qu'un premier abord de l'érythrocyte sain ou malade.

Toutefois on peut retenir l'allure asymétrique de l'histogramme de répartition de la population de sujets sains établissant l'existence d'individus hypoactifs : la nature des mécanismes en cause restant à établir.

L'étude de la population de malades nous a montré que les résultats d'activités appréciées par le test au BM, pouvaient être expliqués, pour 40 % d'entre eux seulement, par la fluctuation normale du taux de G6PD (Cf. Fig. 55), laissant un pourcentage important (29 %) de sujets très hypoactifs bien que le niveau d'activité en G6PD soit normal.

Nous avons pu voir que tous les niveaux d'activité pouvaient s'observer avec le colorant, chez les sujets présentant une valeur élevée de G6PD (Cf. Région B, Fig. 55).

Enfin, il est possible que l'addition à la Figure 55, d'un troisième axe, sur lequel serait figurée l'activité de la $NADPH_2$ diaphorase, dissocierait peut-être ce dernier ensemble.

Des travaux sont en cours à ce sujet ; il serait aussi intéressant d'étudier corrélativement le niveau de la consommation en oxygène, en présence du colorant.

Quoi qu'il en soit, il est bien probable que les niveaux d'activités enzymatiques n'expliquent pas la totalité du phénomène. Nous ne pouvons pas préciser pour l'instant, la nature exacte des facteurs membranaires intervenant dans la perméabilité. Néanmoins, si l'implication de différents groupes antigéniques se confirmait, il serait du plus haut intérêt de donner un développement immunologique ultérieur à cette recherche.

Enfin l'étude de sujets déficients en G6PD nous a montré que cette enzyme représente une condition sine qua non de la pénétration du colorant. Il vaut mieux dans ce cas exprimer le résultat du test en «Δ_{10} apparent», et nous avons vu (Cf. Fig. 58), que les sujets porteurs du déficit complet ou partiel se rangent dans la classe la plus hypoactive vis-à-vis du test au BM, une séparation des enzymoprives totaux et des hétérozygotes semble possible. Mais nous remarquerons que ce dernier point nécessite une confirmation ultérieure, car l'étude des sujets faviques (famille SP... Fig. 60) nous oblige à des réserves.

Au total, il est intéressant de considérer les modalités de réoxydation du NADP réduit selon le type de substance oxydante en cause. Comme nous l'avons résumé au niveau de la figure 61 bis, le $NADPH_2$ a le choix d'une réoxydation selon deux voies :

– l'une passe par le glutathion ; nous l'avons appelée voie 1 et elle comprend la glutathion réductase et la glutathion peroxydase ;

– l'autre –voie 2– comprend la $NADPH_2$ diaphorase.

Enfin, il faut ajouter à ce schéma le rapport $\frac{\text{NADP oxydé}}{\text{NADP réduit}}$. Toute élévation de ce rapport du fait de l'introduction d'un oxydant exogène dans le système, provoque une stimulation de la voie des pentoses.

Or, il est intéressant de considérer la part relative de la voie 1 et de la voie 2 sus-décrite dans la lutte contre une agression oxydante.

On peut apprécier la prédominance de la voie 2 pour une substance donnée, en étudiant dans les mêmes conditions l'importance de la stimulation de la voie des pentoses chez le sujet normal et chez un sujet déficient en $NADPH_2$ diaphorase. Il semble que tout supplément d'activité pourrait être interprété de manière simple en supposant que l'action réductrice de la voie 2 doit être remplacée chez le sujet déficient par un surcroît d'activité de la voie 1 qui agira par suppléance.

Un tel travail a été réalisé par SASS (21) et nous avons déjà mentionné les résultats de cet auteur au niveau de la figure 19. Dans l'interprétation précédente rentreraient : la primaquine, l'acétyl phényl hydrazine, le naphtol, le ferricyanure de potassium, le dichloro phénol indophénol, la cystéine.

Un deuxième cas pourrait être représenté par celui de la vitamine C dont l'action oxydante se réalise principalement selon la voie 1 ; la voie 2 étant tout-à-fait accessoire et en son absence la stimulation de la voie des pentoses pratiquement inchangée. On sait que le glutathion réduit a pour rôle non seulement de réduire l'acide déhydroascorbique, mais aussi d'alimenter la glutathion peroxydase qui doit lutter contre la formation d'eau oxygénée qui s'élabore au contact de la vitamine C et de l'oxyhémoglobine.

SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES PREFERENTIELLES DE REOXYDATION DU $NADPH_2$ EN PRESENCE DE SUBSTANCES OXYDANTES

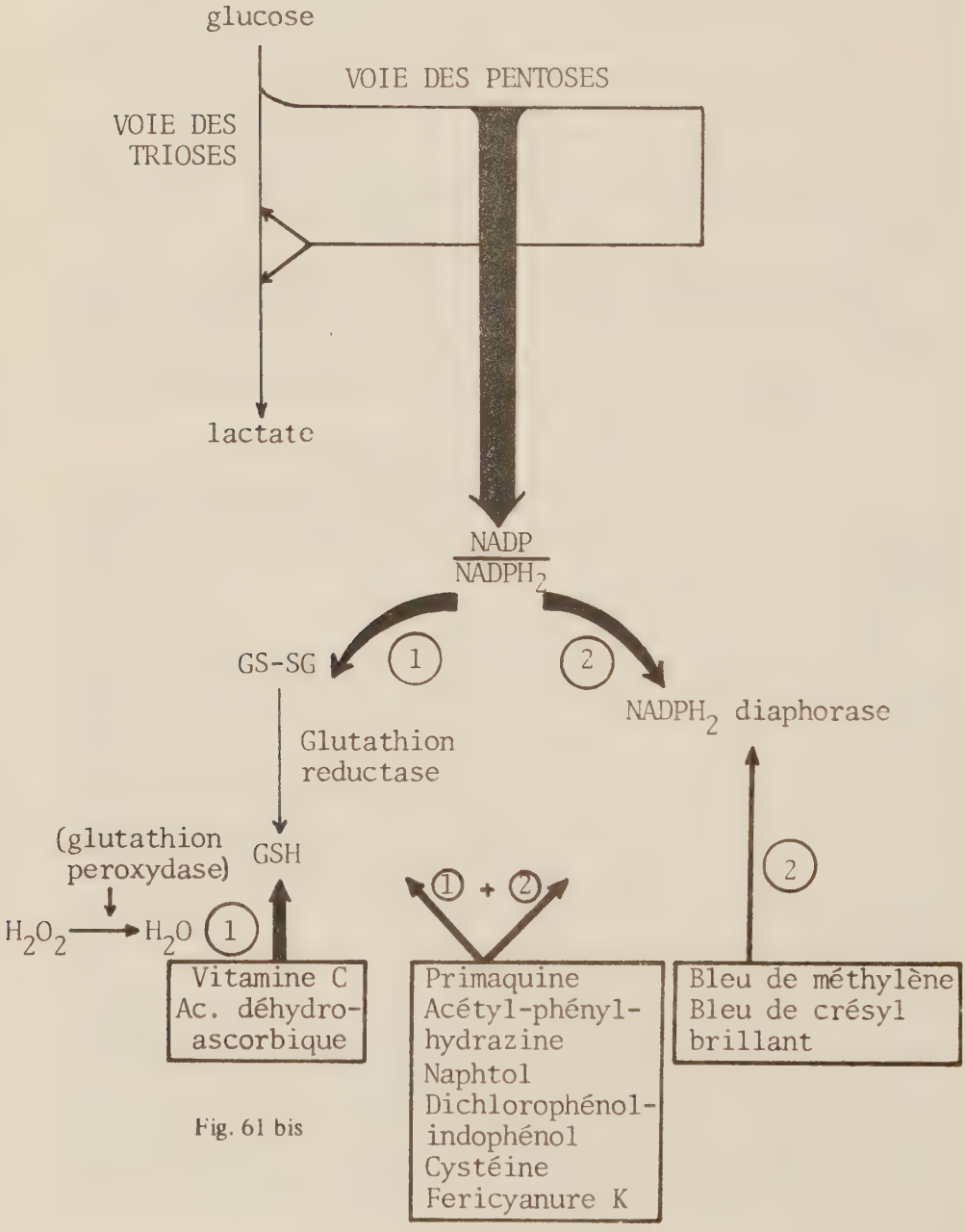


Fig. 61 bis

Un dernier cas, et ce sera notre conclusion, est représenté par le bleu de méthylène*. SASS a bien montré (cf Fig. 19), l'incapacité du colorant à stimuler la voie des pentoses lorsque l'érythrocyte est déficient en $NADPH_2$ diaphorase : seule la voie 2 est capable d'être une voie d'utilisation du $NADPH_2$.

Enfin, cette large prépondérance de la voie 2 dans le cas du BM peut être appuyée par des arguments qui montrent l'inutilité de la voie 1 dans la stimulation de la voie des pentoses par le bleu : PRINS a montré que la voie des pentoses est stimulée de manière normale par le BM au niveau de l'érythrocyte déficient en glutathion (du fait de l'absence héréditaire en glutathion synthétase) (100).

Enfin, les mêmes remarques ont été faites par WALLER chez un sujet déficient en glutathion réductase (100).

* Ainsi que le bleu de crésyl brillant.

TROISIEME PARTIE

ETUDE ETHNO–BIOLOGIQUE

Les pages qui précèdent concernaient l'étude du métabolisme oxydatif érythrocytaire de sujets originaires du Haut Languedoc : tous adultes des deux sexes qui constituaient notre lot de référence. Jusqu'à maintenant il ne nous a pas été possible d'appliquer le test au bleu de méthylène à des échantillons de races différentes. La seule exception étant donnée par un groupe de malades que nous avons par ailleurs étudiés : en effet, parmi eux nous avons relevé un certain nombre d'individus d'ascendance méditerranéenne ; leurs pays d'attache étaient les suivants : Côte Provençale, diverses provinces de l'Italie Continentale ou Insulaire, enfin la Corse.

Ce groupe, bien que numériquement beaucoup plus faible comparé aux sujets du Haut Languedoc, représente avec lui le seul élément que nous possédions pour le moment dans l'application de notre test aux enquêtes ethno-anthropologiques. Mais les progrès récents de la cryo-biologie notamment dans le domaine de la conservation du sang à très basse température dans de l'azote liquide, permettront peut-être de résoudre le problème de la qualité de la survie des cellules sanguines, les premiers essais réalisés dans ce sens par certaines équipes étant très encourageants.

Outre le test au bleu de méthylène, l'enzyme-clé de la voie des pentoses : la glucose-6-phosphate-deshydrogenase (G6PD), a été dosée. Depuis 15 ans, ce facteur constitue un marqueur privilégié, dont l'étude s'est révélée extrêmement fructueuse en anthropo-biologie.

Au cours de cette dernière partie, notre attention portera plus particulièrement sur l'aspect génétique et la répartition mondiale des divers types de G6PD dans les races humaines étudiées jusqu'à ce jour.

Enfin, nous poursuivrons en analysant une mutation particulière de cette enzyme : l'anémie hémolytique favique parmi nos échantillons locaux et dans la race méditerranéenne.On sait en effet que cette affection singulière, provoquée par l'ingestion d'une légumineuse commune dans les pays méditerranéens apparaît assez fréquente dans certains groupes humains. Elle pose trois ordres de problèmes : ethnologiques, physio-pathologiques et écologiques.

Depuis les travaux de l'Ecole Italienne (SANSONE, BONSIGNORE, FORNAINI, SINISCALCO), Grecque (STAMATOYANOPOULOS) et Américaine (KIRKMAN, PORTER et BOYER), il est permis de se demander si cette mutation n'intervient pas comme facteur sélectif dans cet environnement particulier que constitue le milieu méditerranéen, et ne peut pas être considéré comme un agent essentiel du polymorphisme équilibré au même titre que le paludisme.

CHAPITRE PREMIER

I – ETUDE GENETIQUE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE –

Nous rappellerons que l'aspect biochimique du déficit enzymatique a déjà été abordé au cours des chapitres précédents. Nous n'indiquerons donc ici que les modalités de la transmission du déficit dans les générations successives.

CHILDS a montré en 1957, que le défaut en G6PD obéit chez l'homme, aux lois de l'hérédité. Les recherches de cet auteur et celles de MARKS et GROS en 1959, ont établi que le locus contrôlant la biosynthèse de la G6PD était lié au chromosome sexuel X.

Nous étudierons successivement :

– les preuves de la transmission par le chromosome X

– les règles de transmission

– la transmission familiale

– les particularités du sujet hétérozygote

– la situation du gène sur la carte du chromosome X

1 - PREUVES DE LA TRANSMISSION PAR LE CHROMOSOME X

Les études de CHILDS et BROWNES appuyées par celles d'autres auteurs, ont montré de façon définitive, que l'enzymopénie telle qu'elle se rencontre dans les races noire et méditerranéenne , est dûe à un gène porté par le chromosome X. Les arguments réunis sont les suivants :

1) Le père, atteint, transmet l'anomalie à ses filles mais jamais à ses fils ; la mère par contre transmet l'anomalie aux garçons et à certaines de ses filles.

2) Les individus dont le caryotype est X O (syndrome de TURNER), présentent lorsqu'ils sont porteurs, l'enzymopénie dans sa forme la plus complète. (déficit total).

3) Dans les populations où le défaut est suffisamment répandu, les sujets les plus intensément atteints sont de sexe masculin : les accidents hémolytiques observés chez eux sont beaucoup plus sévères. Par contre la tare est plus fréquente chez la femme.

4) Le déficit en G6PD peut être inclus dans un même «groupe de liaison» avec l'achromatopsie ou le groupe sanguin Xg : tous deux portés par le chromosome X.

Enfin, l'étude de l'expressivité de la tare au niveau d'une population donnée fait apparaître les différences suivantes :

– parmi les individus de sexe masculin, il existe deux groupes : l'un de sujets normaux, l'autre de sujets atteints. Chez ces derniers, l'activité enzymatique est toujours très basse.

– parmi les individus de sexe féminin, une analyse fine des résultats montre l'existence de trois catégories d'individus : un groupe de femmes normales, un groupe très restreint de femmes porteuses d'un déficit complet, enfin un groupe assez important ayant une activité intermédiaire. Ce dernier groupe correspond aux femmes hétérozygotes dont un des deux chromosomes porte l'anomalie, l'autre étant normal.

Au total, si la transmission du défaut enzymatique se fait bien selon un mode lié au sexe, il doit être possible à partir de la fréquence de la tare chez les hommes, de la calculer chez les femmes.

2 - LES REGLES DE LA TRANSMISSION

Le principe du calcul est le suivant :

– la probabilité pour qu'un chromosome X porte l'anomalie est p

– la probabilité pour qu'il porte le gène normal, son allèle, est q.

Il n'y a aucune autre possibilité et $p + q = 1$.

Chez l'Homme :

Dans le caryotype normal on ne trouve qu'un seul chromosome X. La fréquence de l'anomalie est p (par exemple si 5% des hommes sont tarés $p = 0,05$).

Chez la Femme :

Elle possède deux chromosomes X. En supposant la population infinie et les unions faites au hasard, on peut calculer les probabilités de recombinaisons des gènes normaux et anormaux et on obtient :

$$(p + q)^2 = p^2 + q^2 + 2\,pq$$

p^2 représente la fréquence attendue des homozygotes

q^2 représente la fréquence attendue des sujets normaux

2 pq représente la fréquence attendue des femmes hétérozygotes

p (taux d'hommes atteints)	2 pq (taux de femmes hétérozygotes)	p^2 (taux de femmes homozygotes)	$p^2 + 2pq$ (taux de femmes porteuses de la tare)
1	1, 98	0, 01	1, 99
2	3, 92	0, 04	3, 96
5	9, 5	0, 25	9, 75
10	18	1	19
15	25, 5	2, 25	27, 8
20	32	4	36
30	42	9	51
40	48	16	64

Calcul des fréquences attendues des différents génotypes chez la femme à partir du taux de sujets masculins atteints, pour une anomalie portée par le chromosome X.

Fig. 62

Fréquence du défaut en G6PD les sujets masculins	Union d'une femme saine et d'un homme taré	Union d'une femme hétérozygo- d'un homme :		Union d'une femme homozygote et d'un homme :	
		sain	taré	sain	taré
p	pq^2	$2pq^2$	$2p^2q$	p^2q	p^3
1 %	980	1 960	19, 8	9, 9	0, 1
2 %	1 940	3 881	78, 4	39, 2	0, 8
5 %	4 512	9 025	475	327, 5	12, 5
10 %	8 100	16 200	1 800	900	100
20 %	12 800	25 600	6 400	3 200	800
30 %	14 700	29 400	12 600	6 300	2 700

PROBABILITÉS DES MARIAGES DES SUJETS TARÉS

(D'après Suaudeau)

Cette table est établie en supposant la population infinie, les mariages au hasard et la mortalité infantile consécutive au défaut en G6PD nulle. Elle donne les probabilités pour que tel ou tel type d'union se produise, en fonction de la fréquence de la tare dans la population masculine. Pour en simplifier l'expression, le calcul a été fait pour 100 000 mariages, ce qui est l'ordre de grandeur du nombre de mariages annuels contractés dans la population noire des États-Unis, ou dans la région Sicile-Sardaigne-Italie du Sud.

Fig. 63

Il est alors possible de calculer pour différentes valeurs de p, la fréquence attendue de chaque combinaison. Une telle abaque a été reproduite au niveau de la Figure 62.

Cette étude a été entreprise par MOTULSKY en Afrique Noire et FLATZ en Thaïlande, les résultats obtenus ont confirmé cette hypothèse.

3 - LA TRANSMISSION FAMILIALE

La transmission du défaut en G6PD se fait grâce au chromosome X (liaison au sexe) avec dominance incomplète. Ceci signifie, en supposant que le chromosome x est normal et X porteur du déficit, que :

– le génotype d'un sujet masculin ne peut être que x y (normal) ou Xy (hémizygote atteint). Dans ce dernier cas, le défaut enzymatique est complet.

– le génotype féminin peut être :

- xx (homozygote normale)
- XX (homozygote anormale)
- xX (hétérozygote anormale)

Le déficit enzymatique trouve son expression complète dans le deuxième cas (activité nulle) ; dans le troisième, en raison de la dominance incomplète du gène, les manifestations cliniques et biochimiques, bien que présentes, sont atténuées (type intermédiaire).

Au total, il existe deux génotypes chez les hommes et trois chez les femmes. Il en résulte six combinaisons possibles au cours d'un mariage.

Nous allons étudier le génotype de la descendance en laissant de côté le cas de l'union d'un homme normal avec une femme normale. Le calcul de la fréquence de chaque génotype nous a montré selon les cas, une inégalité des fréquences. Il en résulte que trois combinaisons sont relativement fréquentes (Cf. Fig. 63) :

– union d'un homme atteint et d'une femme saine

– union d'un homme atteint et d'une femme hétérozygote

– union d'un homme sain et d'une femme hétérozygote

et deux combinaisons ont une probabilité beaucoup plus faible : elles concernent les mariages d'une fille homozygote avec un homme sain ou atteint.

Nous allons envisager la progéniture issue de ces différentes unions. Bien entendu, les proportions de chacune d'entre elles ne se vérifient que statistiquement (Cf. Fig. 64).

1) *Mère porteuse hétérozygote et père sain :*

Parmi les fils, on trouve que la moitié des sujets sont sains, l'autre moitié atteinte. Parmi les filles, en principe la moitié est hétérozygote, l'autre est normale. En fait, la proportion de filles hétérozygotes (jugée sur le phénotype d'activité intermédiaire), est plus faible. Il existe donc une certaine proportion de filles à phénotype normal, mais de génotype hétérozygote ; pour le prouver, il faudra attendre la 3è génération et ces filles mettront au monde des garçons porteurs de la tare.

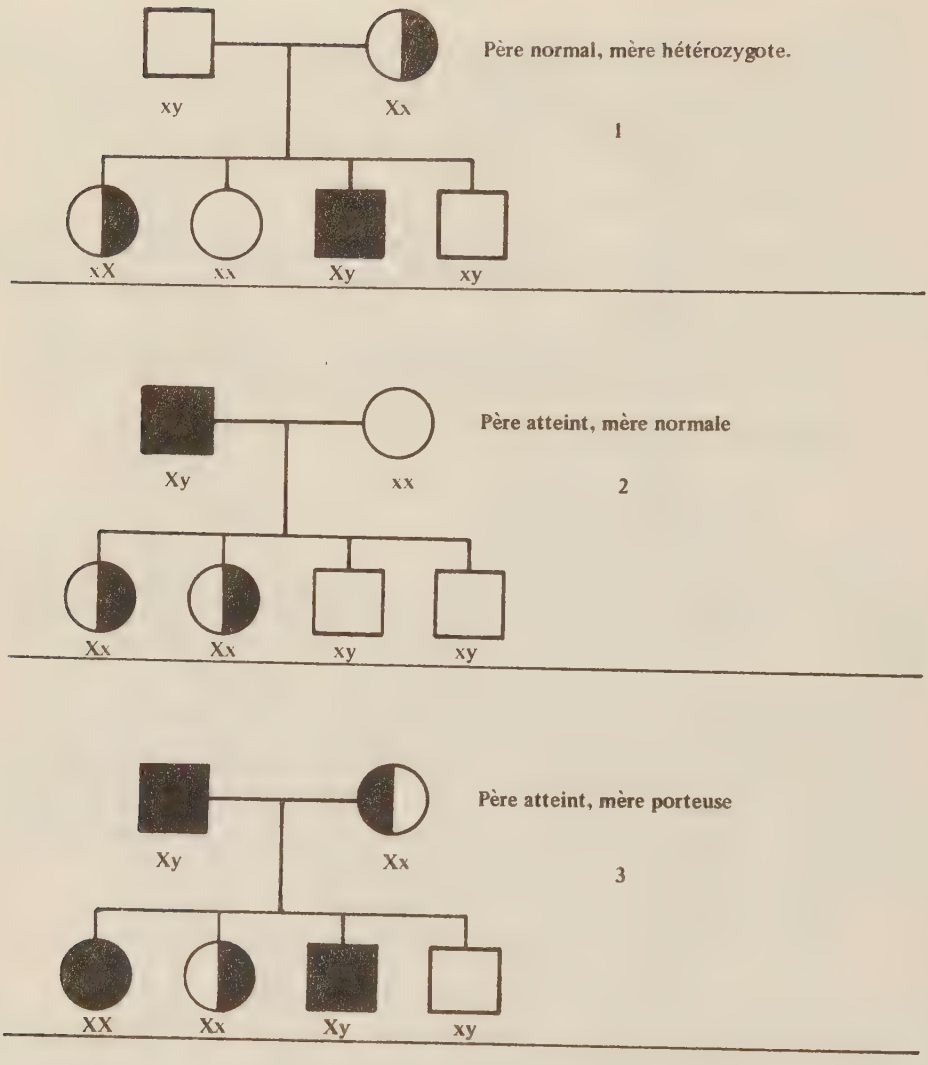


Fig. 64

Lois de transmission du déficit en G6PD dans les trois types d'unions les plus fréquentes.

2) Père porteur (hémizygote) ; mère saine :

Dans ce cas tous les garçons seront sains, car le père ne peut pas transmettre la tare à ses fils. Mais toutes les filles seront hétérozygotes. Il faut remarquer que dans certains cas, la transmission ne suit pas cette loi. En fait, la mère peut être phénotypiquement saine, bien que de génotype hétérozygote, comme nous l'avons vu dans le cas précédent et elle pourrait être rangée à tort dans le groupe des femmes normales.

3) Père porteur, mère hétérozygote :

Ce type d'union apparaît dans deux cas : lorsqu'il existe une forte proportion de sujets atteints ou lorsqu'un groupe vit en endogamie.

Dans ce cas, la moitié des garçons sont atteints. La totalité des filles sont tarées : pour moitié à l'état hétérozygote, l'autre moitié à l'état homozygote.

Au total, les trois quarts des sujets issus de cette union sont porteurs de l'anomalie.

Enfin, il nous reste à envisager les deux possibilités assez rares, du mariage d'une fille homozygote.

4) Mère homozygote, père sain :

La totalité de la progéniture reçoit la tare. La totalité des garçons sont atteints (hémizygotes). La totalité des filles sont hétérozygotes.

5) Mère homozygote, père atteint :

Toutes les filles sont homozygotes, tous les garçons sont hémizygotes ; donc la totalité de la progéniture est tarée.

Cette éventualité est très rare ; on estime qu'une dizaine de mariages de ce type auraient lieu chaque année en Sardaigne.

4 - PARTICULARITES DU SUJET HETEROZYGOTE

Nous avons déjà relevé que l'expressivité du déficit chez la femme hétérozygote est variable, et toutes les valeurs d'activité enzymatique peuvent s'observer, allant d'un niveau intermédiaire à la normalité.

Ces faits ont reçu une explication dans l'hypothèse de Lyon. Elle postule que l'un des deux chromosomes X (d'origine paternelle ou maternelle), subit une inactivation durant la vie embryonnaire. Le choix se fait au hasard, il est irrévocable et transmis à la descendance cellulaire. Chez les humains, ce phénomène surviendrait vers le 12è jour du développement embryonnaire. Dans la majorité des organismes, on trouve à peu près autant de cellules inactivées d'un groupe que de l'autre. Mais on peut rencontrer des individus où le hasard a amené une prédominance des cellules à X paternel inactivé, ou au contraire à X maternel inactivé. On conçoit qu'un gène avantageux ou non puisse être favorisé (Cf. Fig. 27) et on peut ainsi expliquer les grandes variations d'activité enzymatique dans ce cas. On peut en outre remarquer que d'autres causes gênent l'appréciation de ce niveau.

En effet, le taux de toutes les enzymes érythrocytaires est fonction de l'âge moyen de la population cellulaire. Dès lors, l'activité de la G6PD peut être surestimée, lorsque le sujet, après une hémolyse, voit s'accroître le nombre de formes jeunes dans le sang.

Au total, nous retiendrons que les érythrocytes circulants représentent une mosaïque pour le gène responsable de l'activité en G6PD, de nombreuses expériences ayant confirmé cette hypothèse.

5 - SITUATION DU GENE SUR LA CARTE DU CHROMOSOME X

On a tout d'abord essayé de vérifier l'hypothèse de Lyon en utilisant un autre marqueur du chromosome X : le groupe érythrocytaire Xga. L'étude de l'agglutination des érythrocytes provenant de femmes hétérozygotes (Xga^b/Xga^-) n'a pas confirmé l'hypothèse de Lyon et en aucun cas il n'existe une population résiduelle d'érythrocytes non agglutinés. Il est donc possible que l'inactivation proposée par Lyon, ne soit que segmentaire : le fragment chromosomique inactivé portant le gène de la G6PD à l'exclusion du gène Xga. Quoi qu'il en soit, la position du locus G6PD a pu être déterminé avec une relative précision. Alors que conformément à la troisième loi de MENDEL, les caractères héréditaires doivent être transmis indépendamment les uns des autres, on note que certains d'entre eux se retrouvent associés de génération en génération : l'ensemble des caractères ainsi associés est appelé «groupe de liaison», et les gènes dont ils dérivent sont situés sur le même chromosome.

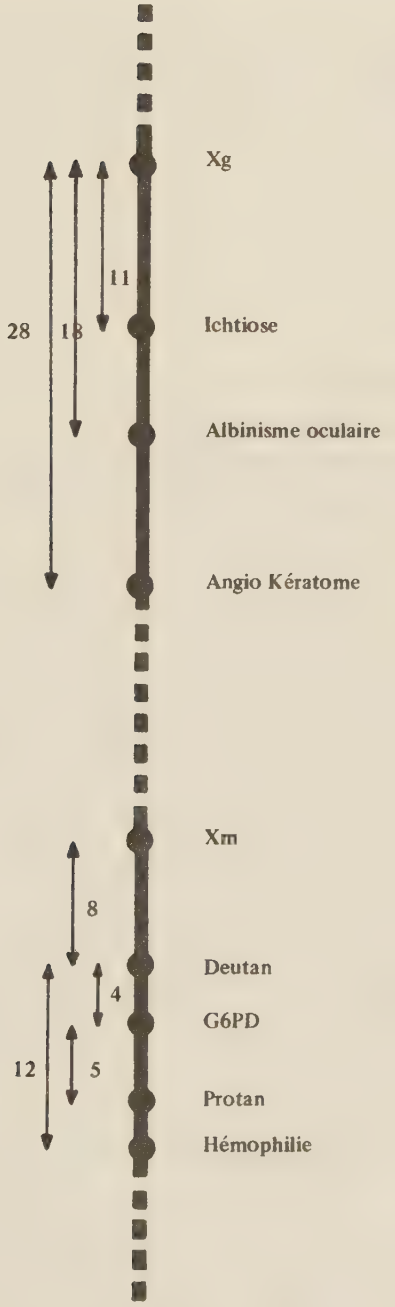
Les études sur la topographie du chromosome portent sur la fréquence du crossing-over : deux gènes auront d'autant plus de chances d'être séparés que leur distance est grande et réciproquement. L'étude au niveau de la descendance, des recombinants, c'est-à-dire des cas où les deux gènes ont été séparés, nous fournira la fréquence du crossing-over, elle-même proportionnelle à la distance séparant les deux gènes sur le chromosome. Nous avons résumé les résultats de cette estimation au niveau de la Fig. 65 et nous avons noté la position du locus de la G6PD, et de quelques anomalies héréditaires transmises par le chromosome X. Nous ajouterons que des travaux récents semblent indiquer qu'une autre enzyme érythrocytaire : la phosphoglycérate-kinase, paraît avoir une hérédité liée au sexe (186) et il semble exister une double population.

De fait, le modèle génétique du défaut en G6PD, est singulièrement compliqué à la suite de la découverte de nombreuses variantes moléculaires. On a été conduit à tenter d'appliquer le modèle de JACOB & MONOD qui laisse supposer deux types de mutations :

– des mutations portant sur un ou plusieurs gènes régulateurs aboutissant à une variation quantitative de l'enzyme dont la structure demeure normale,

– des mutations structurales qui entraînent la synthèse d'une enzyme dont l'activité pourra être normale ou modifiée.

Les mutations structurales peuvent n'avoir aucune conséquence sur l'activité de l'enzyme, elles rentrent dans le cadre du polymorphisme génétique d'une population, dont les individus sont tous normaux. A l'opposé, une mutation structurale pourra modifier le site actif de l'enzyme et par conséquent son activité, ce qui conduira à un tableau clinique de gravité variable.



Carte du chromosome X humain (D'après K. Berg) Fig. 65

En fait, ce schéma ne peut être que partiellement appliqué au polymorphisme génétique de la G6PD. Une étude structurale de l'enzyme implique une analyse minutieuse quantitative et qualitative des acides aminés constituant la protéine. Une investigation de ce type est précédée d'une purification qui nécessite de grandes quantités de sang : elles sont malheureusement prohibitives, car elles devraient être accrues chez le sujet dont l'activité est diminuée.

Il y a là un obstacle momentané, qui espérons-le, sera surmonté par la mise au point de microméthodes d'analyses.

Pour l'instant, les critères d'identification d'une mutation reposent sur l'étude de cinq paramètres et selon les recommandations d'un groupe d'experts de l'OMS, on devrait rechercher (42) :

1 - l'activité de la G6PD érythrocytaire

2 - la migration électrophorétique

3 - la constante de Michaëlis (Km) pour le G6P* et le NADP**

4 - le taux d'utilisation du 2 d G 6 P***

5 - la thermostabilité et le pH optimum

Dans certains cas, l'activité enzymatique est si faible que les autres critères ne peuvent être déterminés et l'électrophorèse est irréalisable. Bien des mutations ont été définies à partir des deux premiers critères et remarquons que l'identité de la migration électrophorétique de deux enzymes mutées est très insuffisante pour affirmer la similitude de structure. Dans ce cas, la mise en évidence d'un comportement différent, au cours d'une chromatographie, pourra en apporter la preuve.

En conclusion, nous retiendrons que l'étude de mutations est relative à la définition qu'on en donne, c'est-à-dire dépendante de la puissance des moyens d'analyse mis en jeu. C'est la raison pour laquelle l'énumération des différentes variantes enzymatiques décrites dans les races humaines est associée aux critères de définition biochimique encore imparfaits, que nous avons énoncés ci-dessus.

En dernier lieu, nous devons remarquer que ces recherches de génétique n'ont été jusqu'alors envisagées qu'à la lumière des études concernant la seule cellule de l'organisme qui semble «souffrir» du déficit enzymatique : l'érythrocyte. Nous verrons que l'examen des différentes mutations affecte de manière très variable, le niveau enzymatique des autres tissus.

A l'heure actuelle, ce problème n'est pas résolu, et il n'est pas exclu que d'autres gènes situés sur des autosomes compliquent le modèle génétique de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

* *G6P : Glucose 6 phosphate*

** *NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*

*** *2dG6P : 2 désoxyglucose 6 phosphate*

II – LES VARIANTES DE LA GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASE –

Depuis la découverte de ce défaut en 1956, une quarantaine de variantes ont été décrites et nous les envisagerons par ordre de fréquence en décrivant successivement :

– le type «noir» du défaut en G6PD

– le type «non noir» du défaut en G6PD

– les groupes des anémies hémolytiques chroniques par défaut en G6PD

– les types rares

A – LE TYPE «NOIR»

Il correspond à un déficit modéré et il persiste au niveau des érythrocytes une activité résiduelle de 10 à 20 % de la normale chez les homozygotes. Le niveau d'activité est normal dans les leucocytes ; l'activité serait basse dans les plaquettes.

Au niveau des autres tissus, les résultats sont variables. Du point de vue clinique, ces sujets présentent des hémolyses aiguës provoquées par la prise des antipaludéens du groupe des amino 8 quinoléine. La liste des médicaments potentiellement hémolytiques chez le noir déficient est beaucoup plus courte que dans les autres types ; en sont exclus notamment les biguanides, la quinine, l'aspirine, la vitamine K_2 et les sulfones (Cf. Fig. 66).

De plus, on doit noter l'absence d'ictères du nouveau-né ou d'anémie hémolytique chronique. Du point de vue biochimique, on sait que les premières caractérisations structurales ont été basées sur l'étude de la migration électrophorétique. Ainsi les sujets blancs normaux possèdent une fraction enzymatique B (+), dont la migration est plus lente que celle qu'on rencontre chez certains noirs. Dans ce dernier groupe, on trouve environ 60 % de sujets normaux possédant la fraction B (+), 20 % de sujets normaux possédant une fraction enzymatique à migration plus rapide appelée A (+) ; enfin 20 % de sujets porteurs du déficit en G6PD : la fraction enzymatique résiduelle A (-) ayant une migration comparable à la fraction A (+) (Cf. Fig. 45).

Cette identité de migration des enzymes A (-) et A (+) a pu faire croire abusivement à une identité de structure : la variante A (-) étant interprétée comme une mutation quantitative. En fait, des expériences de migrations sur colonne de CM Séphadex ont montré que les molécules enzymatiques des sujets A (+) et A (-) étaient différentes.

B – LE TYPE «NON NOIR» DU DEFAUT EN G6PD

D'une façon peut-être artificielle, on réunit dans ce groupe l'enzymopénie de type méditerranéen et l'enzymopénie rencontrée en Asie.

Le déficit dans ce cas est plus sévère ; il diffuse au delà des érythrocytes et la liste des médicaments provoquant une hémolyse aiguë est très longue. Une forme particulière est représentée par le favisme ou anémie hémolytique provoquée par l'ingestion de fève (vicia faba). Ce dernier type se rencontre plus particulièrement dans les populations méditerranéennes et sera étudié à part.

C – LES ANEMIES HEMOLYTIQUES CHRONIQUES PAR DEFAUT EN G6PD

Elles n'ont fait l'objet que d'une quarantaine d'observations, concernant dans presque tous les cas, des sujets de race blanche.

Le déficit enzymatique est en général sévère chez l'homozygote, sans que ce caractère ait une valeur absolue. De nombreuses variantes moléculaires ont été décrites. Du point de vue clinique, les sujets homozygotes présentent des signes d'hémolyse chronique dont la physio-pathologie reste obscure. Chez le sujet hétérozygote, on a mis en évidence un raccourcissement de la durée de vie des hématies.

Ces individus sont très sensibles à la prise de médicaments et font une hémolyse aiguë pour de faibles doses de nivaquine ou d'aspirine.

Il semble que l'on rencontre un plus grand nombre de cas d'ictères du nouveau-né dans les familles enzymopéniques.

Au total, nous retiendrons la rareté de cette forme avec anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, qui a été décrite principalement dans quelques familles d'Europe Continentale.

D – LES TYPES RARES

Ils regroupent des observations isolées, très éparses à la surface du globe, s'accompagnant parfois d'une chute d'activité très faible, ou encore d'une activité normale mais d'une augmentation de la labilité thermique.

Leur étude offre peu d'intérêt clinique, toutes les formes pouvant se voir. Nous ferons une place à part à deux variantes possédant une activité supérieure à la normale en l'absence de tous signes cliniques.

Le tableau suivant (Fig. 67), résume les différentes variantes mondiales connues jusqu'à ce jour et qui ont été répertoriées par un groupe d'experts de l'OMS (42) et plus récemment par BEUTLER (185).

Au total, il convient d'insister sur un point bien particulier : les moyens actuels ne nous permettent pas une définition moléculaire précise de toutes ces mutations. Jusqu'à ce jour, l'analyse structurale a été effectuée uniquement sur deux variantes très répandues ; YOSHIDA a montré, par la méthode des finger-prints, que la variante A (+) différait de la variante B (+) par le remplacement d'un acide aspartique par de l'asparagine.

Ce même auteur a précisé les propriétés de l'enzyme normale B (+). D'un poids moléculaire de 240 000, il serait formé de deux chaînes α et $\in$ dont la cohésion est assurée par du NADP. Chaque chaîne pourrait provenir de la réunion de trois subunités. Enfin, mentionnons que des expériences d'hybridation moléculaire ont pu être réalisées à partir de chaînes α et $\in$ d'origines différentes : par BEUTLER et COLLINS entre enzyme B humaine et la G6PD de rat (187), entre enzyme de rat et de boeuf (188), et par YOSHIDA entre enzyme B et variante humaine SEATTLE (189) ; ces mêmes auteurs ont provoqué la formation d'un hybride des formes A (+) et B (+) humaines : dans ce cas l'hybride n'est pas détecté sur les électrophorèses mais sur colonne de CM sephadex.

EFFET DES MÉDICAMENTS SUR LES ERYTHROCYTES DÉFICIENTS EN G6PD

Drogue (avec la dose quotidienne)	preuve expérimentale basée sur l'administration de la drogue à des volontaires, déficients en G6PD.		Preuve clinique basée sur des observations rapportées.	
	sujets noirs	sujets blancs	malades noirs	malades de race blanche
Drogues provoquant une hémolyse cliniquement apparente.				
Acétanilid 3,6 g	+ + +			
Diaphényl sulfone 200 mg	+ +			
25 mg	+ —	+ + +	+ +	
Furazolidone : 400 mg	+ +			
Furmethonol 1,0 g	+ +			
Naphtalène			+ + +	+ + +
Néoarsphenamine 600 mg			+ +	
Fèves (1)				+ + +
phosphate de pentaquine 30 mg	+ + +			
pamaquine naphtoate 30 mg	+ + + +			
primaquine 30 mg	+ + +			
Nitrofurazone 1,5 g (Furacine)			+ + + +	
Nitrofurantoïne 400 mg	+ +			
Chlorhydrate de Phényl Hydrazine 30 mg	+ +			
90 mg	+ + + +			
Quinocide 30 mg	+ + +			
Quinodine 0,8 g				+ +
Sulfanilamide (Septoplix) 3,6 g	+ + +			
5 g	+ +			
N Acetyl sulfanilamide	+ +			
Sulfapyridine: 4,0 g (Dagenan)	+ + +			

Sulfamethoxypyridazine (Kynex) 2, 0 g	+ +			
Salicyl azosulfapyridine (Salazopyrine)	+ +			
Acide Nalidixique (negram)	?			
Drogues ne produisant pas l'hémolyse cliniquement apparente dans les conditions normales (par exemple en l'absence d'infections).				
Phenacetine 3,6 g	+			
Aspirine 4-12 g	+ —			
3, 6 g				
Amiline 30 mg	0			
Antazoline (Antistine) 400 mg	0			
Acide Ascorlique 1,5 g	+		+	
Chloramphénicol 1,0 g				+ +
2,0 g	0			+ +
Chloroquine 300 mg	+ —			
Dimercaprol (BAL)	+			
Diphenhydramine 300 mg (Nautamine)	0			
Menadione sodium bisulfate 10 mg	0			
Bleu de Méthylene 390 mg	+			
p Hydroxyacétanilide 3,6 g	0			
Para aminophénol 100 mg	0			
Acide para amino-benzaïque	0			
Procaïne amide (Pronestyl)	0			
Probenecid 1,0 g (Benemid)	0			
Sulfadiazine		0		
Sulfamerazine 5 g (Solumédine)	0			
Sulfisoxazole 5 g	0			
(Gantrisine) 6 g	0			
8 g	+ +			

Sulfathiazol 5 g (Thiazomide)	0			
Sulfoxone de Sodium 300 mg	+			
Tripelennamine 300 mg	0			
Pyrimethamine	0			
Quinine 2 g (2)	0			
Quinacrine 100 mg	+ −			
Nitrite de soude	0			

Fig. 66

La gravité de l'hémolyse est notée 0 ; + − ; + ; + + ; + + + ; + + + + ; depuis «pas d'hémolyse» jusqu'à l'hémolyse très grave.

(1) La réponse est erratique et peut être en rapport avec un facteur extroglobulaire.
Il semble exister un rapport entre la fièvre bilieusehémoglobinurique processus hémolytique aigu et l'administration de quinine, même à très faibles doses. En revanche, il n'existe pas de relation connue entre l'administration de quinine et le déficit en G6PD.

TABLEAU DES VARIANTES DE LA G6PD (Fig. 67)

VARIANTE	POPULATION	Activité érythrocytaire % de la N	Mobilité électrophorétique en % de la N	K_m G6P μM	K_m NADP μM	Utilisation du 2d G6P	Thermostabilité	Optimum de pH	Fréquence dans la population	Observations
Normale B	Divers	100	100	50-78	2,9-4,4	< 4	normale	normale	courante	
Madison	Norvégiens	100	faible 70(TEB) 90 (TRIS)	?	?	?	?	?	rare	
King county	Noirs	100	105	61	4	6	?	normale	rare	
Ijebu Ode	Noirs	100	85	60	24	11(14mM)	diminuée	biphasique	rare	
Ita-Bale	Noirs	100	65	91	11	14(14mM)	faiblement diminuée	normale	rare	
A (+)	Noirs	88	élevée (1)	normale	normale	< 4	normale	normale	très répandue	sérologiquement indiscernable de B +A −
Baltimore Austin	Noirs	75	faible 90	68	3,1	< 4	normale	normale	rare	
Ibadan Austin	Noirs	72	faible (2)	62-72	3,3	< 4	normale	normale	rare	
Minas Gerais	Brésiliens	< 70	95	41	4	9	?	normale	rare	
Madrona	Noirs	70-80	80	32	3,5	normale	?	normale	rare	
Barbiéri	Italiens	40-60	élevée 135	Accrue	Accrue	?	normale		rare	
Capetown	sujet noir du cap norvégiens	52-80	55-65(TEB) 76-88(TRIS) 35-48(PO_4)	11-14	0,2-1	7-16	normale	biphasique	?	
Kerala	Asiatiques indiens du S.E.	50	faible 75(TEB) 90(TRIS)	23	1,5	7,4	normale	biphasique	rare	
Columbus	Noirs	35	normale (100)	normale	normale	normale	?	?	rare	

Tel Hashomer	Juif(Sefardin tunisien)	25-40	faible 60-70	30-40	?	normale	normale	légèrement biphasique	rare	
Athènes	grecs	20	98	19	3	15	faiblement diminuée	faiblement biphasique		Variante isolée d'un groupe plus hétérogène
Porto-Rico	Porto-Ricain	19	112	18,6		2,7	faiblement diminuée	probablement N		
Washington	Noirs	16	95	57,4		1,6	normale	normale		
Markham	Nouvelle Guinée	15-10	105-108	4,4-6,3	?	162-222	? (réduite)	très biphasique	?	
Kabyle	Algérien	14-36	104(TEB) 110(PO_4)	68		10 (identique au contrôle)	normale	normale		
Loyola	irlandais allemands	15	faible 90	?	?	?	?	?	rare	probablement identique à G6 PD seattle
Seattle	gallois Ecossais Grecs	8-21	faible 90	15-25	2,4-2,8	7-11	normale	légèrement biphasique	rare	les hématies jeunes ont une activité enzymatique normale
A(−)	Noirs	8-20	élevée 110	normale	normale	< 4	normale	normale	répandue	les hématies jeunes ont une activité presque normale.
Canton	chinois du Sud	4-24	élevée 105	20-36	2,0-2,4	4-15	légèrement réduite	biphasique	répandue	
Bengale occidental	Asiatiques Indiens	9	faible 90(TEB) 94(TRIS)	31	6,6	4	normale	normale	rare	

Benevento	Italien	7	93	4,6		245	diminuée	5,5-9,75 double pic		
Méditerranée	grecs-sardes juifs sefardin Asiatiques Indiens du N.O.	0-7	normale (3)	19-26	1,2-1,6	23,27	faible	biphasique	répandue	le type grec est hétérogène
Hong Kong	Chinois	< 8	100	1/2 N	normale	faiblement augmentée	normale	normale	?	
Panay	iles Visayas Philippines	< 5	96	30	4,7	normale	faiblement augmentée	biphasique		
Paris	français	4	?	280	?	?	très instable	pic important à 9,5	rare	
Union	Philippine	< 3	rapide	8-12	3,6-5,2	180	?	biphasique	?	
	DÉFICIT ENZYMATIQUE AVEC ANÉMIE HÉMOLYTIQUE CONGÉNITALE NON SPHÉROCYTAIRE									
Chicago	Europe occidentale	9-26	normale (100)	58-76	3,1-3,7	< 4	très faible	normale	rare	
Fribourg	allemand	10-20	85(TEB) 90(PO_4)	87-118	4			biphasique		
Duarte	États-Unis	8,5	100	58	5	5,4	notablement diminuée	7,0	rare	
Ohio	Italiens	2-16	élevée 110	légèrement accrue	légèrement accrue	normale	très faible	?	rare	Il pourrait s'agir de G6PD méditérranéen.

Bangkok	Thaï	5	100	60	5,3	8,4	diminution marquée	8,5-8,0	
Torrance	Etats-Unis	2,4	103(PO_4)	48	6	2,4	diminution marquée	normale	rare
Clichy	grec	2	100	178	?	?	?	anormale (plateau 9-10)	rare
Albuquerque	Etats-Unis	1	100	115	11	0	diminution marquée	un pic à 8,5	rare
Milwaukee	porto-ricain blanc	0,5	92	224		3,7		8	rare
Tübingen	Sud de l'U.R.S.S. Hollande	0,3	100	diminué	diminué	?	?	?	rare
Berlin a	allemands	0,1		?	?	0	?	?	rare
Eyssen	Europe occidentale	0	faible 90	?	?	?	très faible à froid	?	rare
Beaujon	France	0	rapide	182			pic à 9,5		rare
		VARIANTE AVEC UNE HAUTE ACTIVITÉ							
Hektœn blan	blanc des U.S.A.	400-500	100 129(PO_4)	51	3,0	3	normale	normale	rare
Hartford	noir des U.S.A.	200	100	?	?	?	?	?	rare

Les notes se rapportent au comportement dans la colonne électrophorèse : (1) différent de B et de A(–) en DEAE et CM Séphadex

(2) différenciable sur CM Séphadex de B, A, A(–)

(3) différenciable de B en gel de $CaHPO_4$.

CHAPITRE TROISIEME

LA REPARTITION MONDIALE DE LA MUTATION

Lorsqu'en 1958 on découvrit simultanément l'existence du défaut en G6PD dans trois parties du monde, aussi éloignées que les Etats-Unis, la Sardaigne et Israël, on comprit qu'il s'agissait d'une anomalie présente dans le monde entier. A l'heure actuelle, l'O.M.S. estime que 100 millions d'individus sont porteurs du déficit en G6PD (42).

Le chapitre précédent nous a déjà montré l'hétérogénéité moléculaire de ce déficit dont on connaît 40 variétés, mais on peut retenir que 4 types sont très répandus (A+ ; B+ ; A– et méditerranéen), les autres représentant des variantes isolées.

A cette hétérogénéité qualitative, s'ajoute une inégalité de la répartition de la tare dans le monde. C'est ce que nous allons envisager dans ce chapitre.

Des cartes, mieux qu'un texte, font apparaître la répartition mondiale de la tare et ses variations régionales (Fig. 68). Cette étude est à l'heure actuelle fragmentaire, et il persiste encore des régions pour lesquelles une analyse statistique précise n'a pas été entreprise.

Le déficit en G6PD est pratiquement absent des régions tempérées et se réfugie principalement dans la zone intertropicale. On peut retenir grossièrement l'existence de deux foyers :

– Le foyer des races négroïdes

– Et celui des groupes humains méditerranéens

Ce dernier cas sera traité à part lorsque nous envisagerons le problème du favisme.

RÉPARTITION MONDIALE DU DÉFICIT EN G6PD

Fig. 68

– EUROPE (Rive Européenne du Bassin Méditerranéen exclue) –

– EUROPE CONTINENTALE.

Le défaut en G6PD est très rare et pratiquement absent. On rencontre d'une part des formes avec anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire et d'autre part des sujets porteurs de la tare dans sa variété «*méditerranéenne*». Ces sujets peuvent se répartir dans deux groupes :

– l'un d'immigrants en provenance de régions méditerranéennes,

– l'autre de sujets sans antécédents méditerranéens.

Dans ce dernier cas, il pourrait s'agir soit d'une mutation récente, soit d'un gène introduit en Europe Occidentale dans un passé très ancien (202, 203, 204).

– AFRIQUE NOIRE –

– ETHIOPIE.

Absence de la tare chez les Ethiopiens (242).
Le paludisme est inconnu dans cette région.

– AFRIQUE OCCIDENTALE.

Entre le tropique du Cancer et l'Equateur s'étend une région relativement homogène sur le plan ethnique, il s'agit de population authentiquement noire et la déficience est largement présente.
Les fréquences les plus élevées s'observent dans le delta du Niger 27 % (205).

– AFRIQUE CENTRALE ET AFRIQUE ORIENTALE.

La fréquence de la tare est très élevée, dépassant 10 % dans les plaines. Au Tanganika, ALLISON note des variations régionales de 25 % à 1 % de la mer vers la montagne (243, 244). Elle correspond à une région où la tare atteint le niveau le plus élevé.
Au total, les fréquences les plus élevées de l'Afrique s'observent au niveau de deux pôles : le delta du Niger d'une part, et le plateau d'Afrique Centrale et le Tanganika d'autre part.

– AFRIQUE AUSTRALE (Union Sud-Africaine ; Betchouanaland).

La population est beaucoup moins homogène. Les autochtones représentent environ 75 % de la population (245, 246, 247, 248).
Chez les bantous, fréquence avoisinant 4 % – Présence de la tare à un moindre degré chez les Hottentots et les Boshimans. Dans tous les cas, le déficit est de type noir.

– descendants d'immigrants : Le peuplement européen ne présente pas de déficit (249)

– MADAGASCAR.

15 % de la population est atteinte, sans que l'on observe de différences entre celles vivant sur les plateaux (de plus de 1.000 mètres) et les groupes du littoral (206, 207).

– ASIE –

– INDE.

Sous-continent très original, peuplé d'indo-européens, de dravidiens négroïdes dans le Sud du Pays et de quelques jaunes. La fréquence des sujets atteints varie avec de grandes différences selon les régions de 0 à 19 % (208, 209).

– CHINE, COREE, JAPON.

La tare est présente en Chine à un taux non négligeable (5 %), principalement en Chine méridionale (Kwan Tung) ; à Formose, la fréquence varie de 3 à 5 % (210, 211, 212).

– MONGOLIE, RUSSIE ASIATIQUE, COREE.

Aucun résultat n'a été publié.

– JAPON.

La tare est absente, ce qui contraste avec la présence d'une autre enzymopathie érythrocytaire : l'acatalasémie.

Le paludisme est inconnu dans ces régions (213, 214).

– ASIE DU SUD–EST –

– PAKISTAN ORIENTAL.

On note quelques observations sporadiques, de même en Afghanistan (42).

– BIRMANIE.

Aucun chiffre publié.

– THAILANDE.

La tare y est très répandue, la fréquence varie selon les régions de 7 à 33 %. Il y aurait une corrélation entre la tare et le paludisme et une corrélation négative entre la tare et l'altitude.

Enfin, la déficience serait un facteur notable d'ictères du nouveau-né (215 à 218).

– INDOCHINE.

Aucune enquête connue au Laos, au Cambodge et au Vietnam.

– MALAISIE (Péninsule de Malacca)

La grande majorité du pays est peuplée de malais. La tare est présente à une faible fréquence : 2 % (219 à 222).

– LES ILES PHILIPPINES.

La tare est prononcée : 5 à 12 % (223).

– INDONESIE.

La fréquence est basse, 1 %, sauf dans le Nord Bornéo (Sabah) et le Brunéi : 6 % (222).

– NOUVELLE GUINEE et PAPUA.

Les fréquences sont très variables et vont de 0 à 33 %. Les Papous de la Nouvelle Bretagne présentent les chiffres les plus élevés. Ces derniers vivent dans une région de forte endémie palustre. On retrouve les deux types d'enzymopénie : *«Noir»* et *«non Noir»* (224).

– LES ILES OCEANIENNES –

– AUSTRALIE.

La tare est absente chez les sujets aborigènes. Parmi les Européens d'Australie, l'anomalie est présente, principalement chez les sujets d'origine méditerranéenne (225).

– MICRONESIE.

L'étude des sujets des Iles Carolines montre un taux variable qui va de 0 à 10 %, il décroît au fur et à mesure qu'on progresse vers l'Est (226).

– NOUVELLE ZELANDE.

Quelques observations sporadiques ont été rapportées (227).

– POLYNESIE.

Un travail récent a montré l'absence d'enzymopénie dans cette région (NIXON : 228).

– CONTINENT AMERICAIN –

– AMERIQUE DU NORD.

1) *Le peuplement autochtone* a presque entièrement disparu et les rares *«indiens»* d'Amérique du Nord sont pour la plupart métissés d'immigrants.

Le déficit est présent à un taux extrêmement faible. Enfin, ajoutons que la tare est absente chez les eskimos.

2) Le peuplement européen d'Amérique du Nord est d'origine nord européenne et nord méditerranéenne, à majorité italienne.

On note quelques rares cas de favisme ou d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire.

3) Le peuplement noir d'Amérique du Nord, concentré initialement dans les Etats du Sud des Etats Unis, s'est répandu ensuite dans tout le pays tout en restant centré autour du bassin du Mississipi d'une part, et de New York et de Chicago d'autre part.

Le taux de la tare diminue au fur et à mesure que l'on remonte vers le Nord, ce qui ferait ressortir le plus grand métissage des groupes noirs du Nord. La fréquence de l'anomalie varie de 7 à 17 % (229, 214, 230, 231).

– MEXIQUE.

La déficience est absente chez les indiens, mis à part quelques groupes (chontal, costa chica, ...) où elle résulte d'un apport de sujets noirs. Chez les métis elle est exceptionnelle (232).

– AMÉRIQUE CENTRALE.

Absence du défaut au Nicaragua (42). Dans les Grandes Antilles on note de rares cas sporadiques dans la république dominicaine.

A Porto Rico : 0 à 4 % (42).

On retrouve la tare dans la population noire de Trinidad : 13 % (233).

A Curaçao : 12,5 % (234).

– AMERIQUE DU SUD.

Ces premières études ont concerné les indiens du Pérou chez qui la tare est absente (235) et il est confirmé que le déficit ne touche que les minorités noires des divers pays comme le Surinam (7 à 20 %), ou le Vénézuéla ; dans ce dernier cas, le déficit est absent chez les indiens (lagune de Sinamaica), présent chez les métis : 2 %, et largement répandu chez les négroïdes : 11,5 % (236, 237).

La population du Nord-Est du Brésil est constituée pour 48 % de sujets blancs, 34 % de noirs et 18 % d'indiens.

La tare touche 7 % des sujets et dans tous les cas se manifeste sous le type A (–) ; la tare est absente chez les indiens (238), de même en Bolivie (239, 240) et en Colombie (241).

– LE DEFICIT EN G6PD DANS LES POPULATIONS MEDITERRANEENNES –

Notre travail nous a amené à nous occuper plus particulièrement des populations méditerranéennes en raison de l'importance numérique dans notre population locale des immigrants notamment d'origine italienne. De plus, certains de nos malades ayant présenté des anémies hémolytiques dues à un déficit en G6PD, avaient une ascendance méditerranéenne.

Nous allons donc aborder l'étude de ce déficit dans ces populations où il est étroitement lié à l'anémie hémolytique favique.

Auparavant nous mettrons rapidement en place les différentes races rencontrées dans le bassin Méditerranéen.

– LE PEUPLEMENT DU BASSIN MEDITERRANÉEN –

Le peuplement du bassin Méditerranéen est réalisé essentiellement par le groupe des races blanches.

On peut distinguer au Nord un groupe Centro-Européen brachycéphale qui d'Est en Ouest, comprend la race Alpine et la race Dinarique, prolongées par les races Touranienne et Anatolienne ; enfin, un élément dolichocéphale représenté par la race méditeranéenne –plus particulièrement riveraine– se poursuivant à l'Est par la race Sud-Orientale (Fig. 69).

Nous allons rapidement envisager ces différents types raciaux, en suivant une progression géographique d'Est en Ouest.

LA RACE ALPINE · correspond à des individus brachycéphales dont la stature est faible.

Cette race occupe essentiellement les régions continentales de l'Europe Occidentale et Centrale ; Centre de la France, Suisse, Italie du Nord, Allemagne méridionale, Bohème et Hongrie. (le petit groupe des Lapons en représente un rameau isolé).

LA RACE DINARIQUE .

Les individus de cette race, brachycéphales comme les précédents, s'isolent par leur stature beaucoup plus grande.

On la rencontre dans les montagnes des Balkans occidentaux et dans les Carpathes.

LA RACE MEDITERRANÉENNE :

Elle est beaucoup plus étendue et présente une plus grande diversité ; cependant, deux caractères demeurent constants : la dolichocéphalie et la pigmentation foncée des yeux, de la peau et des cheveux.

Les méditerranéens typiques appartiennent à la variété ibéro-insulaire, qui correspond à des dolichocéphales de petite taille. Ce morphotype habite la péninsule Ibérique, le Sud de la France et de l'Italie, avec les Iles de la Méditerranée occidentale, le Sud-Est des Balkans.

Une seconde variété, dite Atlanto-Méditerranéenne, se distingue par une taille plus grande et une tête légèrement mésocéphale ; moins fréquente que la précédente, elle s'observe en divers points de l'Espagne et de la France.

Au Sud, la race méditerranéenne occupe toute l'Afrique du Nord et se prolonge à l'Est par la race Sud-Orientale : l'ensemble formant le complexe racial méditerranéen. Il s'étend jusqu'aux limites méridionales du Sahara et forme l'ensemble de *«l'Afrique Blanche»*. On peut diviser celle-ci en trois ensembles : le gros bloc formé par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie et la Tripolitaine que l'on peut réunir sous le nom d'Afrique Mineure, l'Egypte, enfin le Sahara.

Distribution des races blanches en Europe et dans le bassin méditerranéen.

Fig. 69

(D'après H. Vallois, dans les Races Humaines)

L'AFRIQUE MINEURE :

Du point de vue historique, on a pendant longtemps distingué deux composantes : l'une Berbère, représentant le type primitif, l'autre Arabe, descendant des envahisseurs du Xè et XIè siècle. En fait, cette distinction ne tient pas du point de vue de l'anthropologie car bien des *«Arabes»* correspondent à des Berbères ayant pris la langue et les mœurs des conquérants.

Il faut au contraire y substituer trois types anthropologiques aux caractères très différents. Le premier correspond à de petits dolichocéphales et représente l'extension de la variété Ibéro-Insulaire de la race méditerranéenne ; le second comprend de petits brachycéphales appartenant à la race Alpine avec quelques éléments anatoliens. Le troisième type est fait de dolichocéphales de grande taille, à peau beaucoup plus claire.

Leur nombre s'accroît d'Est en Ouest et prédomine au Maroc. La majorité est brune d'yeux et de cheveux, mais dans l'Aurès et l'Atlas marocain, un certain nombre ont les cheveux blonds et les yeux clairs ; ces *«Berbères blonds»* correspondent à la race nordique qui serait entrée précocément en Afrique.

Quant aux grands dolichocéphales bruns, ils ne sont pas le produit d'un métissage de la race nordique, mais représentent une variété de grande taille de la race méditerranéenne, qui est très répandue, plus au Sud : c'est la sous race saharienne.

L'EGYPTE :

Les Egyptiens actuels comprennent deux grands groupes : les Coptes qui sont restés chrétiens, et les Fellahs, complètement islamisés. Tous appartiennent à la race méditerranéenne, avec une certaine infiltration de sang noir qui s'accuse lorsque l'on remonte le Nil.

SAHARA :

Il est à peine habité mais sur son pourtour vivent trois groupes partiellement nomades, les Maures à l'Ouest, les Touareg et les Tibbou au Sud.

L e s M a u r e s occupent le littoral atlantique du Maroc au Sénégal et résultent sans doute du croisement des berbères marocains avec des noirs d'Afrique Occidentale ; ils possèdent une taille élancée à peau très foncée, mais avec des traits européens et des cheveux ondulés ou frisés.

L e s T o u a r e g ont gardé des coutumes très anciennes (matriarcat, distinction en nobles et vassaux), qui ont limité le métissage avec les noirs. Ils sont dolichocéphales, à peau brune ; les yeux et les cheveux sont très foncés et ils sont de grande taille : ils représent typiquement la sous race saharienne.

Ils peuplent le Sahara dans quelques massifs montagneux et les confins Sud du désert.

L e s T i b b o u (ou Gorane) se rencontrent très à l'Est dans le massif du Tibesti et nomadisent du Fezzan au Tchad. Ils semblent appartenir au même type que les Touareg mais avec un plus grand apport négroïde.

Il nous reste maintenant à envisager, pour terminer, l'impact des races de l'Asie Sud Occidentale dans le peuplement de la partie la plus orientale du Bassin Méditerranéen.

Au Nord, l'élément brachycéphale se poursuit par les races Anatolienne et Touranienne ; au Sud, les dolichocéphales de la race méditerranéenne se prolongent par la race sud-orientale.

La race anatolienne (race assyroïde ou arménoïde) est représentée par des individus de taille moyenne ; la tête est brachycéphale mais de plus très haute, s'élevant en pain de sucre. Elle a son centre en Asie Mineure et se prolonge dans le Nord de l'Iran, jusqu'au Pamir.

On a isolé en Arménie méridionale le type arménoïde : le nez prend la forme convexe caractéristique du *«nez juif»* en même temps qu'il y a augmentation de la brachycéphalie et une légère éversion de la lèvre inférieure. Ce type local s'observe chez certains arméniens et diverses tribus kurdes.

La race touranienne (race Turque ou Turco Tartare) qui la longe au Nord, comprend surtout des peuples pasteurs, qui nomadisent dans les steppes de la Russie méridionale et du Turkestan. Elle a été marquée par l'empreinte mongole et rentre dans la catégorie des *«races de contact»* ou *«marginales»*.

Avec la race Sud-Orientale (dite race arabe ou race sémite), nous retrouvons la grande bande dolichocéphale qui bordait les deux rives de la Méditerranée. La taille est un peu supérieure à la normale, la tête très dolichocéphale se termine par un occiput saillant. La pigmentation est foncée, les yeux sont particulièrement noirs. Elle habite des contrées semi-désertiques : l'Arabie, la Mésopotamie, la Syrie intérieure et la Palestine. Enfin elle prend une place importante dans la constitution du peuple juif.

Nos connaissances sur l'origine de toutes ces races sont encore très fragmentaires. Les dolichocéphales de race méditerranéenne pourraient provenir d'une part de l'homme de Chancelade qui vivait à l'âge de la pierre taillée il y a 12 000 à 15 000 ans, mais d'autre part elle contiendrait en outre un élément à face longue venue du Sud.

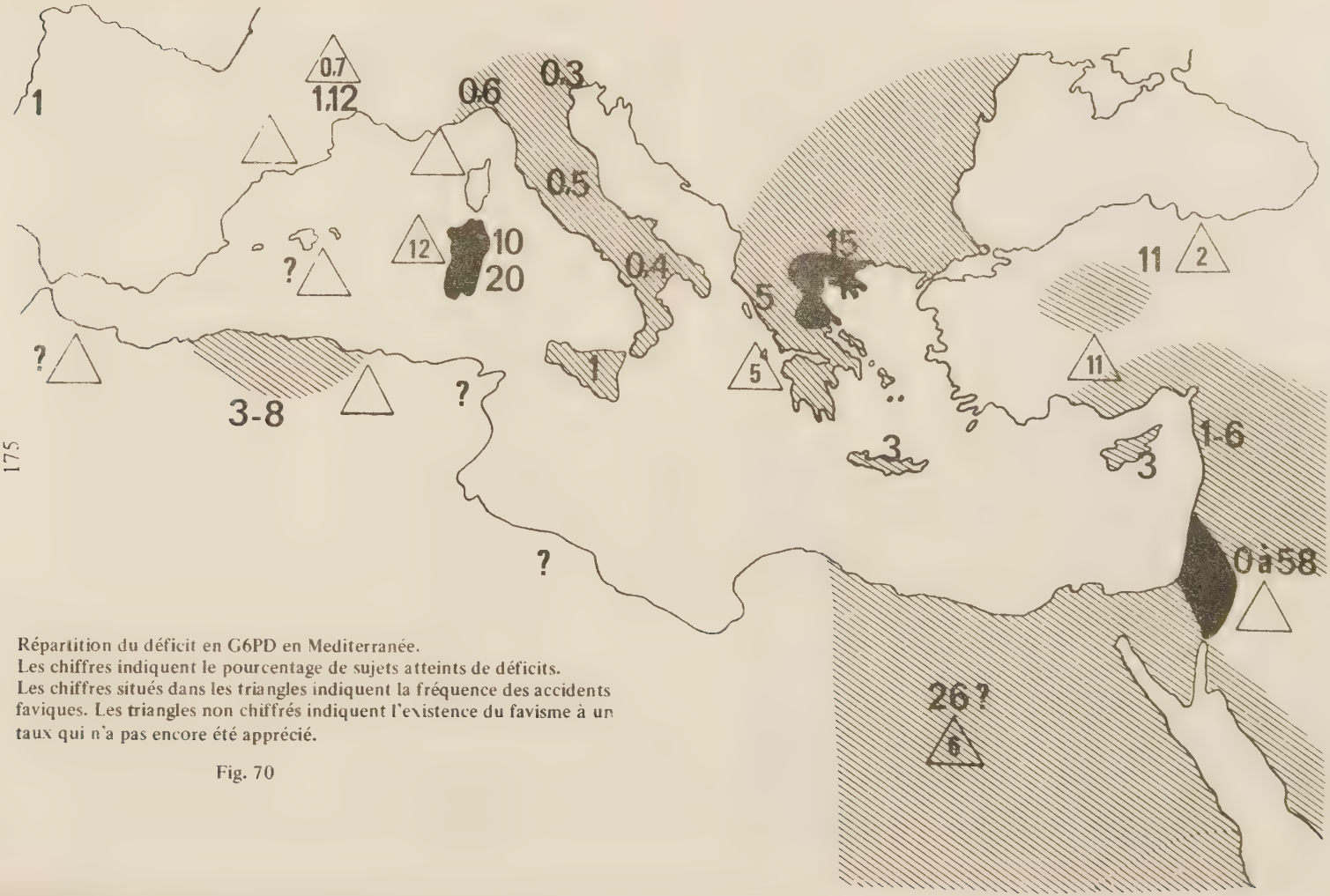
Les brachycéphales seraient venus beaucoup plus tardivement ; les premiers éléments seraient apparus au mésolithique, soit 10 000 ans avant notre ère. Mais la grande extension des Alpins actuels ne date que de 2 000 ans.

Enfin, pour terminer, nous retiendrons l'importance de la race Sud-Orientale qui a été au premier plan dans la production des grandes cultures de l'Orient Antique.

II – LA REPARTITION DU DEFICIT EN G6PD DANS LE BASSIN MEDITERRANÉEN –

La déficience est présente dans toutes les races blanches et sa fréquence a été estimée à une moyenne de 0,1 % pour l'ensemble de la population européenne (sujets mâles uniquement).

En fait, cette moyenne européenne n'a pas grande signification car le taux de mutation varie notablement avec les zones géographiques. De plus, si les groupes humains peuplant les rives de la Méditerranée représentent un foyer où sévit particulièrement le déficit, nous verrons qu'il existe d'importantes variations selon les régions et pour une région donnée selon les ethnies (Fig. 70).



Répartition du déficit en G6PD en Mediterranée.
Les chiffres indiquent le pourcentage de sujets atteints de déficits.
Les chiffres situés dans les triangles indiquent la fréquence des accidents faviques. Les triangles non chiffrés indiquent l'existence du favisme à un taux qui n'a pas encore été apprécié.

Fig. 70

– MEDITERRANÉE OCCIDENTALE :

Le défaut en G6PD est présent avec de fortes variations. D'Est en Ouest :

ESPAGNE ET PORTUGAL.

Au Portugal la tare serait présente au taux de 1 % ; 0,8 % à Madère (190). En Espagne il n'existe pas d'enquête d'ensemble. PELLICER trouve 1 % de déficit dans la province de Huelva, mais aucun cas de favisme.

SANSONNE et FLANTZ trouvent une fréquence de 1 % sur la côte Est et des observations de favisme ont été rapportées (200).

AUX BALEARES.

Le favisme est connu (200) (cas isolés uniquement).

a) Rives méditerranéennes de la France et Corse.

Un grand nombre de cas de favisme survenus dans la région de Nice-Marseille ont été publiés (250 à 256). Si l'on fait exception des sardes et des italiens du Sud émigrés dans cette région, la tare ne paraît pas très fréquente.

Les mêmes remarques s'appliquent à la population du Haut Languedoc où H. VERGNES trouve 1,12 % de déficients (191).

EN CORSE.

Le favisme est connu (257, 258). Nous rapportons un peu plus loin l'observation d'un sujet favique ayant des ancêtres originaires de Corse.

ITALIE.

Un grand nombre d'enquêtes ont été menées dans ce pays et la répartition de la tare est connue avec précision, grâce aux travaux de SANSONE, GEDA et BONSIGNORE.

Une récente revue a été faite par SALVIDIO (192) qui observe : une fréquence de 0,33 à 0,60 % dans l'Italie du Nord, de 0,48 % dans l'Italie du centre, de 0,43 % dans l'Italie du Sud et de 1 % en Sicile.

Ces chiffres permettent de souligner la prudence avec laquelle on doit interpréter les résultats de ces enquêtes.

En effet, précédemment d'autres auteurs avaient trouvé des fréquences beaucoup plus élevées, de 10 fois environ, pour l'Italie continentale avec de plus l'existence d'un gradient Nord-Sud où les fréquences les plus élevées s'observaient dans le Sud de la botte.

De telles variations sont encore possibles au niveau des enquêtes publiées ; les causes d'erreur sont de deux ordres : les techniques de dépistage peuvent surestimer la fréquence des sujets atteints si on n'effectue pas un dosage spédifique de contrôle chez les sujets déficients ; enfin l'échantillon peut ne pas être représentatif de la population : prélèvements réalisés chez des sujets hospitalisés par exemple.

EN SARDAIGNE.

La déficience atteint un très grand nombre d'individus de 10 à 25 % selon les régions et en moyenne touche 14 % des sardes. La Sardaigne est une des régions où se rencontrent les chiffres les plus élevés du Bassin Méditerranéen et il y a dix ans, le favisme tuait en Sardaigne plus d'enfants que les leucoses.

YOUGOSLAVIE.

FRAZER & Coll. trouvent 1 % de sujets déficients (193).

ALBANIE.

Aucun chiffre publié.

GRECE.

Le déficit est présent et de nombreuses études y ont été consacrées. La tare atteint, selon l'endroit 1 à 32 % des sujets.

Une étude régionale particulièrement détaillée a été entreprise par STAMATOYANOPOULOS et MOTULSKY. La déficience est peu marquée dans l'Epire, le Centre et le Sud du Peloponèse (0 à 2 %) et la Crête (3 %). En Grèce centrale elle atteint 10 % en moyenne ; des fréquences plus élevées se rencontrent sur toute la côte Est et le littoral Nord du Peloponèse. Enfin, en Thessalie et en Macédoine on observe les chiffres les plus élevés : 15 % et plus.

En outre, il semble y avoir une coïncidence assez étroite entre les zones géographiques d'endémie palustre --principalement côtières-- et les aires de déficit en G6PD (241).

De plus, STAMATOYANOPOULOS a retrouvé chez un nombre important d'individus un type biochimique particulier du déficit : la variante Athènes (194) que nous avons déjà décrite dans les pages précédentes. Le déficit revêt dans ce cas, chez les sujets masculins, un type *«intermédiaire»* laissant subsister une activité enzymatique résiduelle de 20 % de la normale. On ne sait pas encore s'il s'agit d'une forme biochimique particulière ou d'une anomalie d'expressivité du gène commun.

CHYPRE.

ZANNOS apporte une fréquence de 3,2 % chez les cypriotes grecs.

BULGARIE.

Le favisme est connu depuis les publications de STANCHE ; cependant la tare ne doit pas être très répandue car ces publications ne rapportent qu'un petit nombre de cas alors que la fève est largement consommée (200).

Rive africaine de la Méditerranée.

– AFRIQUE DU NORD –

MAROC.

Aucune enquête publiée jusqu'à ce jour. Quelques observations isolées de favisme ont été rapportées.

ALGERIE.

Le déficit est présent à des taux variables allant de 0 à 12 % (41) suivant les régions. On peut retenir en moyenne une fréquence de 2,78 % pour l'ensemble de la population algérienne ; en Grande Kabylie on observe les taux les plus élevés avec 11,8 % à Bordj-Menaiel.

TUNISIE.

Aucune enquête publiée jusqu'à ce jour. SZEINBERG a retrouvé la tare (2 %) chez les juifs du Maghreb, à une époque où les juifs immigrant du Maghreb en Israël étaient pour leur majorité tunisiens (259).

LIBYE.

Aucune enquête publiée jusqu'à ce jour. SHEBA retrouve la tare chez 1 % des juifs d'Israël provenant de Libye (195).

EGYPTE.

Une enquête effectuée par RAGAB en 1966 relève une très forte incidence du déficit chez les sujets mâles : 26,4 %. Il est probable que ce chiffre est trop élevé car les accidents hémolytiques provoqués par les anti- malariques de synthèse ne se rencontrent, selon cet auteur, que dans un pourcentage de cas quatre fois plus faible (196).

Ajoutons que la fève est très largement consommée dans ce pays.

– PROCHE–ORIENT –

TURQUIE.

Le favisme est connu mais il serait assez peu courant. Le déficit en G6PD est présent à des taux variant de 1 à 11 % (197) mais avec un maximum en Anatolie.

LIBAN.

Le favisme a été rencontré dans les ethnies libanaises mais serait peu fréquent. Le défaut en G6PD existe à des taux très variables. RUFFIE et TALEB (30, 198), ont signalé que la fréquence variait avec les groupes ethniques pratiquement absente chez les druzes de la montagne, la mutation atteint 6,18 % chez les sunnites.

ARABIE SÉOUDITE.

La déficience est présente chez 12,6 % des hommes mais uniquement dans les provinces orientales.

Sa fréquence augmente nettement (jusqu'à atteindre 24.4 % et même 65,4 %) dans certaines régions à forte endémie malarique habitée par des musulmans shiites (199).

IRAK.

La déficience est présente notamment sous une forme particulière : l'anémie printanière de Bagdad. La fréquence se situerait entre 9 et 15 % (42).

ISRAEL.

La tare y est fréquente de type méditerranéen et connaît de grosses variations selon l'origine géographique des immigrants, qui représentent la majorité de la population actuelle de ce pays. Mais sur les plans religieux, sociologiques et culturels, elle descend du peuple juif qui résidait dans la même région il y a vingt siècles.

Il n'est pas certain, à priori, que la pureté génique de ce groupe ait pu se maintenir intacte sur une telle période : le peuple juif a été dispersé, partie par émigration volontaire, partie par déportation, entre 586 av. J.C (déportation de Babylone) et 70 ap. J.C. (destruction du temple par les Romains). Une part importante de la diaspora s'est fondue dans la population où elle s'était installée ; une autre part constituée en petites communautés, continue à vivre loin d'Israël.

Enfin, il faut ajouter qu'au début de l'ère chrétienne de nombreuses conversions eurent lieu sur tout le pourtour du Bassin Méditerranéen. Dès lors, malgré l'isolement génétique de la plupart des juifs dans leurs pays d'adoption depuis la diaspora, les différences ethniques sont apparues entre les groupes, selon leurs pays d'adoption. Les plus frappantes sont celles qui séparent les juifs orientaux (shepardim) et occidentaux (askhenazim).

Les résultats des enquêtes anthropologique et partant des études du défaut en G6-PD reflètent dans leur diversité, à la fois ces différences et le degré d'isolement génétique dans lequel ont vécu les groupes juifs.

Chez les juifs askhenazims, le déficit est très rare : 0,4 % ; il est au contraire beaucoup plus fréquent chez les juifs shepardims. Nous avons résumé ces données dans le tableau de la figure 71 d'après SHEBA (195).

On voit qu'il existe deux cas :

– dans l'un la fréquence est voisine de celle que l'on observe dans le pays d'origine : cas des juifs d'Afrique du Nord (260) ;

– dans l'autre, la différence entre la fréquence de la tare chez les juifs et les populations dont ils sont originaires frappe : c'est le cas des juifs irakiens (260), des juifs du caucase (261), cela traduirait une préservation génétique rigoureuse durant des millénaires. D'autre part, ces différences de taux pourraient correspondre dans une certaine mesure aux différences d'époque de formation du groupe : les juifs de Pers, d'Irak, du Kurdistan sont porteurs de la thalassémie et d'un fort taux de déficit en G6PD et l'on croît qu'ils héritent des juifs déportés dans ces régions six siècles av. J.C., par Babylone : ils auraient vécus depuis en endogamie (262).

Ces études ont été poussées très loin, mais les résultats peuvent recevoir de nombreuses interprétations et ne prennent leur vraie valeur que confrontées à d'autres données ethnologiques.

CONCLUSION

Nous venons d'étudier la répartition mondiale du déficit en G6PD ; nous avons isolé volontairement de cet ensemble les peuples méditerranéens chez lesquels le déficit en G6PD est associé à une forme particulière d'hémolyse : le favisme dont nous allons poursuivre l'étude. Mais auparavant nous ferons quelques remarques.

FRÉQUENCE DE LA DÉFICIENCE EN G6PD PARMI LES SUJETS MALES DE DIFFÉRENTES COMMUNAUTÉS D'ISRAEL

(D'après Scheba)

LIEU D'ORIGINE	Nº D'EXAMEN (au hasard)	% des mâles sensibles
Communautés juives ou ashkenazi		
Asie :		
Kurdistan	196	58, 2
Caucase	25	28
Bagdad	902	24, 8
Iran	557	15, 1
Kochin	58	10, 3
Syrie et Liban	80	6, 3
Yémen	415	5, 3
Inde (Bnei Israël)	102	2
Afrique du Nord :		
Maroc	219	0, 5
Tunisie et Algérie	112	0, 9
Libye	219	0, 9
Égypte	112	3, 6
Séphardim :		
Turquie	256	1, 9
Grèce, Bulgarie	152	0, 1
Autres	93	2, 2
Ashkenazim	819	0, 4
Autres communautés :		
Samaritaine	31	–

Karaïtes	18	–
Falasha	215	–
Cercassiens	55	–
Arabes	264	4,4
Druses	92	4,4

Tableau des Communautés juives

Fig. 71

En regardant les cartes qui précèdent, on ne manque pas d'être frappé par l'extension de l'anomalie dans le monde et pour l'essentiel on peut retenir trois régions : la moitié Nord du Bassin Méditerranéen, l'Asie du Sud-Est et l'Afrique Noire.

Divers auteurs ont tenté d'expliquer comment cette tare était apparue, s'était étendue et surtout s'était maintenue. Dans les lignes qui vont suivre, nous nous limiterons à l'origine et à la dissémination de l'anomalie et nous donnerons un rapide aperçu du problème.

On connaît plusieurs types biochimiques de défaut en G6PD ; ceux-ci dérivent nécessairement de mutations différentes. Il faut donc supposer que la tare est apparue, par mutations, en plusieurs endroits de la planète. Classiquement on distingue deux variantes très largement répandues : le type *«Noir»* et le type *«non Noir»*. Ces faits permettraient alors de supposer que les mutations sont peu fréquentes qu'elles ont atteint un petit nombre d'individus, il y a très longtemps.

Logiquement, on serait amené à croire que la mutation du type *«non Noir»* s'est produite dans le Bassin Méditerranéen où elle s'est ensuite répandue et la mutation type *«Noir»* en Afrique Centrale. La dissémination de la mutation du type *«non Noir»* a donné lieu à diverses hypothèses.

La première est celle de GROSBY ou hypothèse du gène initial. La mutation aurait fait son apparition chez les ancêtres des populations sardes actuelles. Elle se serait maintenue plusieurs siècles dans ce groupe protégé par son isolement insulaire.

Après une période plus ou moins longue, ces populations auraient été en contact avec les phéniciens d'abord, puis avec les grecs, les carthaginois et les romains. Le gène aurait été transmis au cours des unions entre insulaires et étrangers et disséminé dans les différentes parties du Bassin Méditerranéen.

SANSONE (200) a insisté sur la coïncidence remarquable de la répartition de la thalassémie et du favisme dans les populations méditerranéennes. Certes, les deux affections se situent dans des zones géographiques à peu près superposables. De plus, dans quelques cas les deux mutations co-existent chez le même individu. Mais il s'agit d'exception et il est difficile d'admettre une origine commune pour les deux maladies.

Une autre hypothèse a été avancée par ORSINI et BADETTI (201) c'est l'hypothèse anthropologique. En fait, si l'on considère les caractères morphologiques des individus atteints de favisme, on constate qu'ils concordent d'assez près avec ceux de la race méditerranéenne : les faviques sont des dolichocéphales bruns dans la presque totalité des cas. On ne rencontre pas de favisme chez les brachycéphales alpins ou dans la race dinarique. Cette hypothèse serait donc en faveur d'un caractère spécifiquement racial. Elle est certes très séduisante en théorie, mais avec les brassages complexes subis par les populations méditerranéennes au cours des siècles, il est logique de penser que le gène s'est propagé dans tous les groupes de la Méditerranée où on le trouve actuellement.

Par ailleurs, la dissémination du gène *«type noir»* a été suivie de l'Afrique en Amérique. En Nouvelle Guinée on retrouve le gène *«non noir»*, mais aussi le gène *«noir»*.

Au total, on peut retenir que si des imprécisions demeurent, le déficit en G6PD constitue un marqueur de choix dans l'étude des populations. Il est possible que cette étude subisse de profonds remaniements dans l'avenir.

En effet, durant ces cinq dernières années de nombreuses variantes moléculaires ont été décrites et on en connaît une quarantaine à ce jour. Si elles apparaîssent pour une grande part comme des mutations isolées, certaines pourront être reconnues comme caractéristiques d'un groupe humain, dans la mesure où la description d'un déficit s'accompagnera d'une meilleure définition biochimique de l'enzyme mutée.

Ainsi l'unicité et la très large répartition que l'on reconnaît à l'heure actuelle à la mutation du *«type noir»* ou à celle du type *«non noir»* pourra alors subir d'intéressantes modifications.

CHAPITRE QUATRIEME

LE FAVISME

Le favisme est connu en clinique depuis la fin du siècle dernier, mais on a de bonnes raisons de croire que les anciens égyptiens et les grecs en avaient une idée. Cette affectation est due à l'ingestion de fève et frappe surtout l'enfant.

A peine l'incidence du déficit en G6PD sur la sensibilisation globulaire à la primaquine est-elle connue, en 1956, que SANSONE en Italie reprend le problème du favisme sur les mêmes bases.

En 1958, LARRIZZA retrouve le défaut en G6PD au niveau des globules rouges faviques. Ces travaux furent confirmés dans toute l'Italie et surtout en Sardaigne par PANIZON.

La description clinique de l'hémolyse favique est bien connue : on assiste à une crise d'hémolyse aiguë, parfois bénigne, parfois très grave, provoquée par l'ingestion de fève : 84 % des accidents s'observent avant 20 ans et il n'y a aucune prédominance selon le sexe ; ils sont exceptionnels après 40 ans.

I – L'AGENT CAUSAL : LA FEVE –

L'aliment en cause, dont la consommation est à l'origine du syndrome hémolytique est une légumineuse papillonacée du genre Vicia Faba. Cette culture est très ancienne ; on en retrouve les traces dès la plus haute antiquité.

Déjà, au VIe siècle avant notre ère, Pythagore disait aux siciliens : *«méfiez-vous des fèves»*. La culture a continué à s'étendre sous les grecs. Un seul pays faisait alors exception : l'Egypte Pharaonique, un édit royal interdisait la consommation de cet aliment.

On pense que ce sont les navigateurs phéniciens, puiscarthaginoisqui ont introduit la fève dans la plupart des pays méditerranéens et ce fait a été retenu par certains auteurs pour expliquer la dissémination du gène favique.

A l'époque romaine cette légumineuse constituait une denrée largement consommée dans les pays de l'empire, et continue de nos jours à figurer parmi les aliments habituels des peuples méditerranéens. Les graines sont absorbées crues ou cuites, plus

rarement à l'état sec ou sous forme de farine. La consommation est essentiellement saisonnière, ce qui explique le maximum de fréquence des accidents à la fin du printemps.

Les habitudes alimentaires ne sont pas identiques partout ; l'absorption de fèves crues par exemple est plus importante dans les populations des rives européennes de la Méditerranée ; elle est très rare en Afrique du Nord.

Les accidents hémolytiques peuvent avoir dans quelques cas une origine indirecte. C'est ainsi que l'on connaît des crises déclenchées à la suite d'absorption du lait d'une nourrice ou d'une chèvre qui avait mangé des fèves.

Enfin, certains sujets peuvent faire une hémolyse aiguë provoquée par la simple inhalation des pollens de la fleur au printemps. Ces faits sont à rapprocher de ceux que l'on connaît dans d'autres pays pour des anémies toxiques : anémie de Troènes, anémie de Bagdad.

La substance *«toxique»* ingérée ne déclenchera un accident hémolytique que chez les individus présentant un *«terrain favorable»* et porteur du déficit en Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase.

II – LA REPARTITION GÉOGRAPHIQUE DU FAVISME –

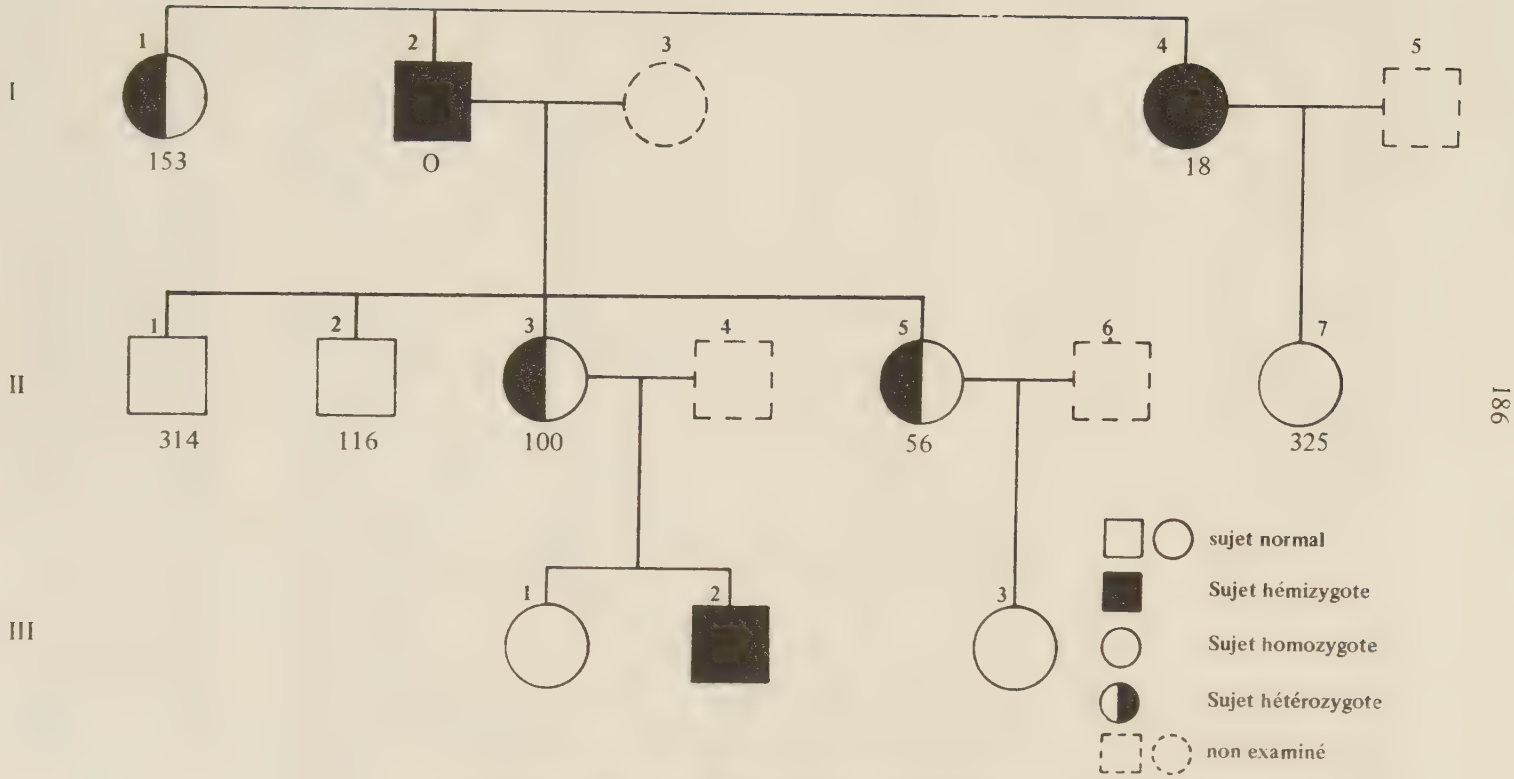
On peut dire que grossièrement, les cas de favisme se rencontrent dans le Bassin Méditerranéen là où existe déjà un foyer de sujets déficients en G6PD. En fait, cette affirmation est partiellement inexacte et l'on connaît des familles de sujets déficients en G6PD qui ne présentent aucun accident après ingestion de fèves.

– DANS LA POPULATION DU HAUT LANGUEDOC.

Les études de H. VERGNES ont souligné la très faible incidence du déficit en G6PD : 1,12 % (191), avec 0,69 % de sujets faviques. Les cas de favisme ainsi rapportés ont concerné des sujets dont l'origine méditerranéenne a pu être démontrée. Sardes, Italiens et Corses.

Nous avons pu analyser quelques éléments du comportement biochimique de tels érythrocytes déficients en présence de bleu de méthylène et nous rappellerons que cet aspect a déjà été envisagé au cours des chapitres précédents. Toutefois une observation récente concernant la famille Gr... dont nous avons dressé l'arbre généalogique (Fig. 72), nous amène à faire deux remarques. L'histoire est la suivante :

– Aimé Gr... (sujet n° 1 de la génération I), âgé de 63 ans, est né en Algérie de souche française (toulousaine). Une grand-mère maternelle est corse. Dans les ascendants et collatéraux, on n'a jamais signalé d'accidents alimentaires, d'ictères ou d'anémie. Il a lui-même mené une existence normale jusqu'à ce jour. Aucun épisode pathologique n'est connu ; en particulier pas de troubles d'origine alimentaire ou médicamenteuse. Or, fait intéressant, ce sujet militaire de carrière ayant vécu une partie de son existence en Afrique du Nord et tropicale, a pris régulièrement pendant plus de 30 ans des antimalariques (quinine, chloroquine). De plus, il se souvient avoir tout au long de sa vie absorbé des fèves sans aucun ennui. Brusquement, au printemps de l'année 1968, l'ingestion d'un plat de fèves a déclenché l'apparition d'une crise hémolytique suraiguë avec collapsus circulatoire grave, suivie d'un ictère et d'une hémoglobinurie nécessitant une hospitalisation d'urgence.



Arbre généalogique de la famille Gr... atteinte de déficit en G6PD
Fig. 72

Les examens biologiques pratiqués révèlent l'enzymopénie : défaut complet en G6PD dans les érythrocytes, abaissement du glutathion réduit, chute considérable de l'activité dans les leucocytes ; enfin, la migration électrophorétique est de type B. Donc favisme indiscutable chez un enzymoprive complet du type méditerranéen.

L'interrogation plus approfondie de ce sujet nous a révélé qu'il avait ingéré des fèves durant deux jours consécutifs et au moment de la crise, il affirme n'avoir pris aucun médicament.

Cette remarque permet de faire ressortir la notion de dose seuil telle qu'elle a été constatée par d'autres auteurs (263). Mais il pouvait paraître étonnant de constater une première crise de favisme à cet âge : de tels accidents sont décelés dans la grande majorité des cas chez l'enfant, et de plus ce sujet avait pu ingérer impunément des fèves lorsqu'il vivait en Afrique du Nord. Une explication a toutefois été avancée, et étayée par les données de l'interrogatoire de ce sujet : celle d'une sensibilité variable selon la variété de fève en cause.

En effet, ce sujet a mangé en Afrique du Nord, sans inconvénient des fèves à gousses courtes (dont il existe de nombreuses variétés) et des fèves à gousses longues dans la variété : fève de Sicile encore appelée fève de Marais. Ce sujet vit actuellement en France depuis quelques années. Or, l'accident hémolytique a été provoqué par l'ingestion en grande quantité d'une variété de fèves qu'il n'avait pas jusqu'alors consommée : la fève de Séville à longue cosse.

Ainsi apparaîtrait la notion de sensibilité variable selon la variété botanique. Toutefois, ce sujet se souvient avoir consommé antérieurement des fèves dites *«d'Agua Dulce»* à cosses immenses (35 à 40 cm), sans être incommodé en aucune manière. Or, la fève d'Agua Dulce n'est pas à proprement parler une variété distincte de la précédente : c'est la fève de Séville dans son maximum de développement ; le nombre de fruits étant dans ces plantes en raison inverse de leur développement (264).

Il apparaîtrait alors non seulement une sensibilité variable selon la variété de fève ingérée mais variable aussi selon le mode de culture de la variété en cause.

Le mécanisme des accidents hémolytiques est encore très mal connu. Nous rappellerons que deux théories s'affrontent :

– La théorie immuno-allergique de KANTOR (265) et GREENBERG (266). Certaines substances chimiques renfermées dans les graines de fèves pourraient une fois introduites dans l'organisme, induire la formation d'anticorps. Ceux-ci auraient une action lytique directe sur les hématies possédant un taux de G6PD abaissé avec chute du glutathion réduit. Mais l'existence de ces anticorps n'a jamais été établie avec certitude.

– Les théories chimiques paraissent plus vraisemblables. Les travaux de PANIZON (267) font un parallèle entre l'action des extraits de fèves et celle de la primaquine sur les érythrocytes de sujets sensibles, et les substances en cause pourraient être de nature pyrimidique (268).

Un autre élément intéressant apparaît dans la généalogie de la famille Gr... L'examen de la figure 72 nous montre en deuxième génération un sujet (n° 2) de sexe masculin qui présente de manière tout-à-fait paradoxale un déficit de type intermédiaire

avec un niveau d'activité situé à 50 % environ de la normale. L'électrophorèse de l'enzyme révélait une migration du type B, normale. D'autres investigations sont en cours à l'heure actuelle à la recherche d'une meilleure caractérisation de l'enzyme. Nous avons pu noter que BONSIGNORE et FORNAINI rapportent une observation apparemment du même type dans une famille de sujets vivant dans l'Italie du Nord (269) et aucune explication ne peut en être donnée pour l'instant dans l'état actuel de nos connaissances sur la mutation enzymatique.

CHAPITRE CINQUIEME

DEFICIENCE EN G6PD ET ENVIRONNEMENT

La dissémination du défaut en G6PD et sa persistance avec une fréquence élevée dans certaines régions pose le problème de la survie d'une tare qui au premier abord apparaît défavorable.

Or, la découverte du défaut en G6PD est survenue au moment où se clôturait un débat à propos du maintien du gène drépanocytaire dans les populations de la zone intertropicale.

ALLISON a démontré à propos de l'hémoglobinose S, qu'un avantage sélectif était conféré aux hétérozygotes vis-à-vis du paludisme, les dangers de la tare étant plus atténués chez ces sujets. Ce *«polymorphisme balancé»* par rapport au paludisme explique l'extension de la drépanocytose dans les pays d'endémie palustre.

On a tenté d'appliquer ces données au déficit en G6PD en étudiant les hétérozygotes c'est-à-dire les sujets féminins.

ALLISON a repris la méthode qu'il avait utilisée à propos de la drépanocytose : prise de sang chez les enfants normaux et déficients et comptage des parasites sanguins. Il semble avoir démontré que les enfants hétérozygotes pour le défaut en G6PD ont un taux plus faible de Plasmodium Falciparum mais identique de Plasmodium Malariae, par rapport aux sujets normaux (270). On notera que le Malariae est surtout présent en Méditerranée.

Plus récemment, à Ibadan, LUZZATO a confirmé ces résultats pour le plasmodium falciparum au niveau des deux populations d'érythrocytes normale et déficiente chez le sujet hétérozygote (271).

Toutefois, ces études ne sont pas à l'abri de toute critique, et comme le fait remarquer WILSON, il n'existe pas de corrélation absolue entre le degré de parasitémie et la gravité des symptômes cliniques du paludisme (272).

Par ailleurs, FROMENTIN a montré que la culture in-vitro de trypanosoma gambiense est impossible à partir de sang déficient en G6PD (273). Ce résultat demande d'autres études, mais il élargirait le débat en étendant l'avantage sélectif à la maladie du sommeil.

Par ailleurs, les études de populations ont permis de mettre en évidence des zones où coexistent le déficit et la malaria : au Congo, en Thaïlande, et notamment en Grèce, où il existe une coïncidence assez étroite.

Toutefois, il semble que ce schéma ne puisse pas être généralisé et on connaît des régions de fortes impaludation où la tare est présente à un taux très faible ou nul (plaine de la Mitidja en Algérie) ; de même des zones où le déficit a une haute incidence en l'absence de malaria (Grande Kabylie).

Il n'est pas possible de connaître encore en toute certitude, le rôle exact que joue le paludisme dans la persistance de l'enzymopénie et il peut être imprudent de généraliser à toutes les régions où se rencontre le déficit en G6PD la théorie de l'avantage sélectif conférée par cette mutation, celui-ci ayant surtout été établi pour les pays de l'Afrique humide.

En effet, dans cette zone l'agent sélectif est le plasmodium falciparum qui provoque un paludisme sévère. Mais il n'en est pas de même dans le Bassin Méditerranéen où l'on rencontre en outre les plasmodium malariae et vivax : ces derniers étant responsables de formes plus bénignes.

Nous avons déjà mentionné les différentes hypothèses concernant la dissémination du favisme en Méditerranée : l'une d'elles formulée par SANSONE et reprise par SINISCALCO postule une évolution commune concernant le déficit en G6PD et la thalassémie. Ces auteurs ont pu mettre en évidence une fréquence plus faible des crises hémolytiques après ingestion de fèves chez les sujets sardes porteurs des deux défauts, comparativement aux porteurs du seul déficit en G6PD. Nous avons déjà vu que la fève est cultivée depuis très longtemps en Méditerranée. Nous avons aussi rapporté une observation qui permet de supposer une sensibilité à l'hémolyse variable selon la variété de fève ingérée et le mode de culture de cette légumineuse : tous ces faits ayant pu jouer un rôle dans la répartition du favisme.

Des notions du même ordre ont pu être mise en évidence au niveau de populations non faviques. Ainsi à Madagascar la consommation de certaines plantes, comme le Tanguin, au cours de certaines épreuves, rituelles, pourrait être responsable d'hémolyse grave pour le sujet porteur de l'enzymopénie (275). Au total, on peut penser qu'en dehors de toute agression toxique (médicamenteuse ou nutritionnelle), la mutation enzymopénique peut constituer un désavantage dans le cas des variantes isolées avec anémie hémolytique chronique dont la rareté pourrait être expliquée par un processus de sélection naturelle et d'autre part dans le cas de l'agression néo-natale.

En dehors de ces cas, la déficience ne constitue plus qu'un facteur racial neutre qui pourra atteindre une fréquence élevée dans les populations vivant en endogamie plus ou moins stricte.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, notre travail nous a amené, sur les bases des résultats obtenus notamment par SASS, à étudier les phénomènes d'accumulation et de réduction du bleu de méthylène par l'érythrocyte humain.

Nous avons présenté et justifié un protocole d'étude simple, précis, et de bonne reproductibilité qui a permis une caractérisation assez fine de chaque sujet : le délai nécessaire à l'accumulation et à la réduction d'une quantité donnée de colorant pouvant être appréciée avec une imprécision inférieure à une minute. L'application de ce test à une série de malades nous amontré, qu'en l'absence d'un déficit en G6PD, un certain nombre d'entre eux présente une faible capacité accumulative du colorant et cet aspect a été critiqué et comparé à un groupe de témoins normaux.

Enfin, la perméabilité au bleu de méthylène chute de manière bien plus importante chez les sujets présentant un déficit en G6PD et il semble possible dans ce cas de séparer les individus hétérozygotes de ceux atteints d'une déficience complète.

Ce travail n'a malheureusement pas pu être appliqué à l'analyse de grandes séries d'échantillons provenant de races diverses. Nous avons localisé notre travail à deux groupes de races régionales européennes : les habitants du Haut Languedoc et les individus d'origine méditerranéenne, et nos recherches ont surtout porté sur l'aspect métabolique rédox propre à l'hématie favique.

Etant donné la liaison étroite entre la déficience en G6PD et le favisme nous avons pu intégrer dans ce travail, l'étude de ce déficit dans les différentes races et principalement méditerranéennes.

Par ailleurs nous avons tenté de brosser un tableau des diverses modifications entraînées par l'incubation d'érythrocytes humains avec du bleu de méthylène.

A – L'ECHELLE CELLULAIRE –

– DU POINT DE VUE SPECTRAL –

Nous avons essayé de donner une définition aussi précise que possible des changements spectrophotométriques présentés par des érythrocytes intacts, ceux-ci impliquent au début de l'incubation, une fixation membranaire du bleu de méthylène sous sa forme colorée ; la réduction ultérieure du produit s'accompagnant de la formation d'hémoglobine réduite. La présence de méthémoglobine n'a jamais été détectée.

– LES INTERACTIONS CELLULAIRES –

Elles excluent toute participation leucocytaire, et nous les avons définies dans trois circonstances expérimentales :

– l'accumulation de BM
– la consommation d'oxygène
– la réduction de la méthémoglobine

– DU POINT DE VUE CYTOLOGIQUE –

On peut surtout retenir l'importance des modifications membranaires.

B – L'ECHELLE METABOLIQUE –

On peut retenir l'action inhibitrice du cyanure et de l'ion cuivrique. L'effet du Desferal permet de supposer qu'un co-facteur ferrique est impliqué dans ces phénomènes de perméabilité. Enfin, les fonctions SH membranaires ne jouent aucun rôle.

Après incubation avec le colorant, le niveau de glutathion réduit érythrocytaire tend à augmenter légèrement. De plus, une fraction hémoglobinique supplémentaire apparaît avec une migration électrophorétique identique à la fraction A_3.

– DU POINT DE VUE ENZYMATIQUE –

La modification la plus intéressante apportée par le colorant se traduit par un remaniement de la Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase.

Cette enzyme présente un dédoublement électrophorétique : il apparaît une fraction supplémentaire de migration plus lente et qui aurait une taille moléculaire plus faible que l'enzyme initiale. Ces modifications semblent liées à l'activation de la voie des pentoses et distinctes des sous fractions décrites notamment par KIRKMAN. On l'observe après incubation avec le bleu de crésyl brillant et l'on peut se demander si les changements moléculaires intervenus ne sont pas en rapport avec les modalités très particulières d'oxydation du $NADPH_2$ érythrocytaire.

Ces deux colorants, à l'inverse des autres substances stimulant la voie des pentoses, nécessitent l'intégrité de la $NADPH_2$ diaphorase.

On peut retenir que la stimulation de la voie des pentoses de l'érythrocyte par le bleu de méthylène est un processus différent de l'accumulation du colorant qui apparaît comme un phénomène plus vaste, intéressant notamment la structure membranaire.

Enfin, lorsque l'érythrocyte totalement déficient en G6PD est mis en présence du colorant, on observe une réponse réductrice diminuée mais parfois normale ; on peut se demander dans ce dernier cas si l'imperméabilité presque absolue au bleu de méthylène est en rapport avec le caractère qualitativement inadéquat de la réponse réductrice (provenant de la voie des trioses) ou si la non accumulation du coloration provient d'une anomalie membranaire.

En conclusion, l'incubation d'érythrocyte avec du bleu de méthylène entraîne une réponse réductrice représentée principalement, mais non exclusivement, par l'activation de la voie des pentoses. Le niveau d'activité de cette voie est régulé par la valeur du rapport $\frac{NADP}{NADPH_2}$.

Lorsque l'érythrocyte est mis au contact d'un oxydant exogène, les modalités de réoxydation sont variables et peuvent se faire selon deux voies métaboliques : l'une qui nécessite la régénération du glutathion réduit, l'autre représentée par la $NADPH_2$ diaphorase.

Selon le type de substance en cause, il peut exister une prévalence de l'une ou de l'autre : le bleu de méthylène étant une des rares substances utilisant de manière presque exclusive, la voie de la $NADPH_2$ diaphorase.

BIBLIOGRAPHIE

1 – LUZZATO L. - Régulation of the activity of glucose 6 phosphate déshydrogenase
Biochim. Biophys Acta 146, 18, 1967.

2 – YEN T.F., DAVAR M. - The structure of Héparin : inter action of Héparin with basic dyes by visible spectrometry.
Biochim. Biophys. Acta 184, 646, 1969.

3 – HUENNEKENS F.M. - Érythrocyte metabolism ; III oxydation of glucose
The J. of Biol chemistry 1957, 227, 253.

4 – GUZMAN BARRON E.S., HARROP G.A. - Studies on blood cell metabolism. The effect of methylene blue and other dyes upon the glycolysis and lactic acid formation of mammalian and Avian erythrocytes.
The J. of Biol chem. 79, 65, 1928.

5 – GUZMAN BARRON E.S. and HOFFMAN L.A. - The catalytic effect of dyes on the oxygen consumption of living cells
The J. of Biol chem. 1930

6 – HARROP G.A., GUZMAN BARRON E.S. - Studies on blood cell metabolism. The effect of methylene blue and other dyes upon the oxygen consumption of mammalian and Avian erythrocytes.
The J. of Biol chem 1928

7 – Determination quantitative et qualitative des sulfates de steroïdes à l'aide du bleu de methylene
Rev. franç. d'étude clin. et Biol. 5, 283, 1960.

8 – MAZARD ET CHEYMOL - Manuel de Pharmacologie
Masson

9 – FLORKIN - STOTZ - Comprehensive Biochemistry
Vol 12 62, 88, 1964.

10 – CARTER D.B. - Progress in Biophysics and biochemical chemistry
Pergamon Press 10, 153, 1960.

11 – ANDERSON N.M., SEKELT P. - Studies on the determination of dye concentration in non Hemolyzed blood. The J. of Lab. and clin Med 1968. 72. 705

12 – CABE - Techniques Histologiques
Masson 1968.

13 – CASSELMAN - Histochimie
Dunot 1962.

14 – JENSEN, MONTJAR - Action du bleu de méthylène "nouveau" sur les ribosomes des réticulocytes de Rats.
Nelle rev. franç. d'Hémato . 7, 841, 1967.

15 – SEMAN - La mise en evidence des nucléoles sur frottis par le bleu de méthylène Boraté.
Rev. Franç. d'étude clin et Biol 5, 196, 1960.

16 – BRIN M., YONEMOTO R.M. - Stimulation of the glucose oxidative pathway in human erythrocyte by methylene blue.
The J. of Biol chem. 1958, 230, 307.

17 –BODEA C. and SILBERG I. p. 321 - 455 - Advances in Heterocyclic chemistry
Recent Advances in the chemistry of Phenothiazines
Vol 9, Academie Presse - N.Y. London 1968.

18 – MARTIN D.SASS , CARMINE J. CARUSO and Robert Axelrod D.
Clin. chim. Acta 20, 105, 1968.

19 – MARTIN D. SASS - Évaluation of stored blood viability by methylene blue reduction.
The J. of lab. and clin Med. Vol A3 nº 5 p 744, 1969.

20 – MARTIN D. SASS - Rapid Screening for D - glucose 6 - phosphate : NADP oxidoreductase deficiency with methylene blue.
The J. of labo. and clin. Med. 1966, Vol 68, nº 1, p 156.

21 – MARTIN D. SASS - Observations on the role of TPNH Dehydrogenase in human red cells.
Clin. Chim. Acta 21, 101, 1968.

22 – CARTIER P. LEROUX J.P. - Les modifications immédiates de l'activité glycolytique des globules rouges humains provoquées par le mélange ACD.
Rev. Franç. d'études clin. et Biol. 11, 835, 1966.

23 – MUGHES R.E. - The passage of Vitamine C across the erythrocyte membrane
British J. of Hœmatc 14, 247, 1968.

24 – OMACHI A., SCOTT C.B., HEGARTY H. - Pyridine nucleotides in human erythrocytes in different metabolic states.
Biochim. Biophys. Acta 184, 139, 1969.

25 – DERN R.J., WIORKOWSKI J. - Studies on the preservation of human blood, IV The Hereditary component of pre and post storage erythrocyte ATP Levels
J.of labo and Clin. Med. 73, 1019, 1019.

26 – STURMAN John A. - Oxidative metabolisme of glucose, fructose and galactose by normal and G6 PD deficient human red cell Hémolysate
Clin. Chim. Acta 26, 135, 1969

27 – KEITT Alan S. - Pyruvate Kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis.
American J. of Med. Amer. J. of Med. 1966, 762, 41.

28 – BERTLES J.F., BECK W.S. - Biochemical Aspect of Reticulocyte maturation Fate of the ribonucleic acid.
J. Biol. chem. 237, 3770, 1962.

29 – MARKS Paul A. - Aspect Biochimique du vieillissement du globule rouge et de l'Anémie hémolytique d'origine médicamenteuse.
Nouvelle rev. Franç. d'Hemato 1, 900, 1961.

30 – BERNARD Jean, RUFFIÉ Jacques - Hématologie géographique
Masson 1966.

31 – MADEC Yves - Contribution à l'étude de l'Activité enzymatique dans l'exploration fonctionnelle des globules rouges. Application à quelques cas physiologiques et pathologiques.
Thèse de Médecine no 422 Nantes 1966.

32 – SELWYN and DACIE - Auto hemolysis and others changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. Blood 9, 414, 1954

33 – PIOMELLI S., LORINSKY G., WASSERMAN L.R. - The mechanism of red cell aging, I Relation ship between cell age and specific gravity evaluated by ultracentrifugation in discontinuous density gradient.
The J. of lab. and Clin Med 69, 659, 1967

34 – DANON D., MARIKOVSKY Y - Determination of density distribution of red cell population.
The J of lab. and Clin. Med. 64, 668, 1964.

35 – RAMOT B., BROK M.D.F. - Altération in the metabolism of human erythrocytes with aging.
XII congress of international society of Hœmat. N.Y 1968.

36 VALERI G R., MIRISCH N.M - Restoration in vivo of erythrocyte adenosine triphosphate, 2-3 DPG, potassium and sodium ions concentrations following the transfusion of ACD stored human red blood cell
J. of lab. and clin Med 73, 722, 1969

37 - CHAPMAN R.G , HENNESSEY M A. - Erythrocytic metabolism V Levels of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis
J. of Clin. investig 41, 1249, 1962.

38 – HENNESSEY A., WALTERSDORPH A.M., HUENNEKENS F.M. and BEVERLY W. GABRIO - Erytrocyte metabolim VI Séparation of erythrocyte enzymes from hemoglobin.
J. of Clin. investig. 41, 1257, 1962.

39 – GRANT R. BARTLET - Human red all glycolytic intermediates.
The J. of Biol. chem. 234, 449, 1959.

40 – SHAFER A.W. and BARTLETT G.R. - Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocyte during storage in ACD effect of incubation at 37° with inosine, inosine plus adenine and adenosine after storage for 6, 10, 14 and 18 weeks.
Journal of Clin. investig. 41, 690, 1962.

41 – SUAUDEAU - Le Déficit en G6 PD
Thèse de Médecine 105, 1965, Marseille.

42 – RAPPORT D'UN GROUPE SCIENTIFIQUE DE l'O.M.S. - Normalisation des Techniques d'étude de la glucose 6 phosphate deshydrogénase.
O.M.S. - Série de rapports techniques 366, 1967.

43 – KIRKMAN Henry N. - Glucose 6 phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. I. Further purification and characterization.
The J. of Biol. Chem. 237, 2364, 1962.

44 – YOSHIDA Akira - A single Amino Acid substitution (Asparagine to Aspartic Acid) between normal (B +) and the common negro variant (A +) of human glucose 6 phosphate deshydrogenase.
Process N.A.S. 57, 835, 1967.

45 – YOSHIDA Akira - Glucose 6 phosphate dehydrogenase of human erythrocytes, I Purification and characterization of normal (B +) enzyme.
The J. of Biol. chem. 241, 4966, 1966.

46 – FIORELLI G., ALESSIO L., IDÉO G. - Electrophoretic charactérisation of glucose 6 phosphate deshydrogenase in granulocytes and lymphocytes of normal and fava-bean - sensitive subjects.
Clin. Chim. Acta 25, 177, 1969.

47 – KIRKMAN Henry N. and ELIZABETH HENDRICKSON - Sex-Linked electrophoretic Difference in glucose 6 , phosphate deshydrogenase.
American J. of Human genetic 15, 241, 1963.

48 – SHAW Charles R. and KOEN Ann L. - Glucose 6 phosphate dehydrogenase and hexose 6 phosphate dehydrogenase of mammalian Tissues.
Annals New-York Academy of Sciences, 151, art. 1, 149, 1968, multiple molecular forms of enzymes.

49 – DAVIDSON Ronald - The Lyon Hypotesis
p. 157 - Ann. N.Y. Acad. of Sc. 151, 1968

50 – KIRKMAN H.N., HENDRICKSON E. - Glucose 6 phosphate deshydrogenase from human erythrocyte ; sub-active states of the enzyme from normal persons.
The J. of Biol.. chem. 237, 2371, 1962.

51 – KAPLAN J.C., DREYFUS J.C. et BESSIS M. - La structure en mosaïque du chromosome X chez la femme Essai de démonstration microspectro photométrique d'unedouble population de globules rouges chez les femmes hétérozygotes pour le déficit en G6 PD.
Nouv. revue franç. d' Hémat. 5, 835, 1965.

52 – LYON M.F. - Gene action in the X chromosome of mouse
Nature 190, 372, 1961.

53 – BEUTLER E., BALUDA M. - Methemoglobin reduction - Studies of the interaction betweencell populations and of theroleof methylene blue.
Blood 22, 323, 1963.

54 – ZURCHER C. - Glucose 6 phosphate deshydrogenase deficiency in females diagnosed by partial inhibition of glutathione reductase activity in the erythrocytes after incubation with chromate.
Clin. Chim. Acta 25, 139, 1969.

55 – ZURCHER C., KUIJLMAN F. - Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency in females, diagnosed by partial inhibition of glutathion reductase activity in the erythrocytes after incubation with chromate.
Clin. Chim. Acta 25, 139, 1969.

56 – BREWER G.J., POWELL R.D., SWANSON S.H., ALVING A.S. - Hemolytic effect of Primaquine. XVII Hexokinase activity of G6 PD deficient and normal erythrocytes.
The journal of lab. and clin. med. 64, 601, 1964.

57 – STUART G.A. - Observation on the mechanism of Action of Acetylphenyl hydrazine in normal and G6 PD deficient erythrocytes.
Brit. J. of Hœmat. 16, 435, 1969.

58 – SCHROTER W. - On the significance of the 2-3 Diphophoglycerate cycle in erythrocytes : correlation between methemoglobin and 2-6 dichlorophenol indophenol reduction, glycolysis and 2-3 diphosphoglycerate formation.
Blut. 14/1, 16, 1966.

59 – GRANT R. BARTLETT - Colorimetric Assay Methods for free and phosphorylated glyceric Acids.
The J. of Biol. chem. 234, 469, 1959.

60 – BENESH Reinhold, BENESH Ruth E. - Intracellular organic phosphates as regulator, of oxygen release by Hœmoglobin.
Nature 221, 618, 1969.

61 – HURT G.A., CHANUTIN - Organic phosphate compound of erythrocytes from individuals with uremia.
J. of lab. and Clin. 64, 675, 1964.

62 – COTTE, KISSIN, MATHIEU - Observation d'un cas de deficit partiel en Atpase intra érythrocytaire
Rev. Franç. d'étude clin. et Biol 13, 294, 1968.

63 – ROBIN Helen, HARLEY J.D. - Experience with an extensed Metmemoglobin reduction test. Factors influencing Methemoglobin destruction.
Blood 27 ; 3, 395, 1966.

64 – LEYKO W. - Adenine nucleotides content of human blood hemolysates subjected to the action of K_3 Fe $(CN)_6$
Clin. Chim. Acta 16, 169, 1967.

65 – Protection of Hemoglobin from oxidative breakdown
J. of Biol. Chem. 589, 232, 1958.

66 – JACOB Merry S. and JANDL James H. - Effect of sulfhydryl inhibition on red blood cells I Mechanism of hemolysis.
J. of Clinical investigation.

67 – Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes : Association of type II with fetal hemoglobin. OSKI F.A.
Science 156, 646, 1967.

VALENTINE, W., OSKI F.A. - Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency.
The New England J. of Med. 276, 1, 1967.

68 – KOUTRAS G.A., SCHNEIDER A.S., MATTORI M. and VALENTINE W.N. - Studies on chromated erythrocytes : mechanism of chromate inhibition of glutathion reductase.
Brit. J. Hcemat 11, 360, 1965.

69 – OVERLY W.L., ROSENBERG A. and HARRIS J.W. - Hemoglobin M reserve Studies on identification and characterization.
The J. of Lab. and clin. Med. 69, 62, 1967.

70 – EVELYN K.A. and MALLOY H.T. - Microdetermination of oxy hemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobine in a single sample of blood.
J.. of Biol. chem. 126, 655, 1938.

71 – MUISHAN T.H.S. - Studies on the heterogeneity of hemoglobin. X The nature of various minor hemoglobin components produced in human red blood cell hemolysates on aging.
The J. of lab. and clin. Medic. 63 nº 3, 355, 1966.

72 – CAMERON Bruce F. - Spectrophotometry of Hemoglobin : A criticism
J. of lab. and clin. Med. 72 nº 4, 680, 1968.

73 – FRENDO J. - The role of elementary sulphur and erythrocyte glutathione in the formation of sulphœmoglobin .
Clin. Chim. Acta 24, 1, 1969.

74 – TITUS M.J. HUISMAN and DOZY A.M. - Studies on the Heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione.
The J. of lab. and clin. Med. 60, 302, 1962.

75 – SUSHIELA SWARUP - Methemoglobin level and its relation to the stability of erythrocytic reduced glutathione in Thalassœmia syndrome.
Ind. Jour. Med. Res. 52, 273, 1964.

76 – JAFFÉ Ernst - The reduction of Methemoglobin in human erythrocytes incubated with purine nucleosides.
J. of clin. investig. 38, 1555, 1959.

77 - JAFFÉ - The effects of nucleosides on the resistance of normal human erythrocytes to osmotic lysis.
J. of clin. investig. 36, 1498, 1957.

78 – HARRIS E.J. and PRANKERD T.A. - The effect of adenosine on the movement of between erythrocytes and the suspension medium (Abstract)
Biochem. J. 61 XIX, 1955.

79 – BEUTLER E. - Themechanismof glutathione destruction and protection in drug sensitive and non sensitive erythrocytes.
J. of Clin. invest 36, 617, 1957.

80 – KLEBANOFF S.J. - Glutathione metabolism 2. The oxidation and reduction of glutathione in intact erythrocytes.
Biochem. J. 65, 423, 1957.

81 – MATTHIES H. - Methamoglobin ruck bildung in reticulocyten, Naucryn - Shmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmak. 229, 331, 1956.

82 – MATTHIES H. - Die Wirkung von Aldehydren auf die Methämoglobin rückbildung in erythrocyten.
Biochem. Z. 329, 341, 1957.

83 – RUBINSTEIN - Studies on the preservation of blood.
Canad. J. Biochem. 34, 61, 1956.

84 – LOWY, JAFFÉ B.A. - The metabolism of purine nucleosidesby the human erythrocytes in vitro.
Y. of Biol chem. 230, 409, 1958.

85 – GABRIO - Erythrocyte preservation.
J. of clin. investig. 34, 1509, 1955.

86 – WARBURG - Uber die katalytishe Wirkung von Methylenblau in lebenden Zellen
Biochem. Z 227, 245, 1930.

87 – WENDEL W.B. - Oxydation of lactate by methemoglobin in erythrocytes with regeneration of hemoglobin.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 28, 401, 1931.

88 – KIESE M. - Die reduktion des Hämiglobins.
Biochem. Z. 316, 264, 1944.

89. KIESE M. - Die Reduktion des Hämiglobins. Naunyn - Schmiedeberg's - Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 267, 1947.

90 – SPIGER S. - Studies in vitro on methemoglobin reduction in dog erythrocytes.
J. of Biol. Chem. 177, 217, 1949.

91 – PRANKERD T.A.J. - Revival of stored blood with guanosine and its successful transfusion.
Lancet 1, 469, 1956.

92 – LANGE R.D., CROSBY, GIBSON J.G. - Effect of inosine on red cell preservation
J. Clin. investig. 37, 1485, 1958.

93 – HUENNEKENS F.M., MURK E. and GABRIO Berverly W.- Erythrocyte metabolism - I Purine nucleoside phosphorylase.
The J. of Biol. Chem. 221, 971, 1956.

94 – BERTRAM A. LOWY, JAFFÉ Ernest R. - The metabolism of Purine Nucleosides by the human erythrocyte in vitro.
The J. of Biol. Chem. 230, 409, 1958.

95 – SCOTT E.M., DUNCAN I.W., EKSTRAND V. - The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes.
The J. of Biol. Chem. 240, 481, 1965.

96 – SCOTT E.M. - A comparison of two methods of determining DPNH Methemoglobin reductase.
Clin. Chim. Acta 23, 495, 1969.

97 – HEGESH E. - New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH - methomoglobin reductase) in erythrocytes.
The J. of lab. and clin. med. 72, 339, 1968.

98 – HEGESH E. - The enzymatic reduction of ferrihemoglobin
Biochim. Biophys. Acta 146, 91, 1967.

99 – HEGESH E. - Purification of a ferrihemoglobin reductase from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 146, 397, 1967.

100 – In Hereditary disorders of Erythrocytes metabolism.
Edited by Ernest Beutler - Grume and Statton
N.Y. and London 1967

Methemoglobin reductases F.M. Huennekens 87, 101.
Congenital Methemoglobinemia due to DPNH diaphorase defiency 102, 113.
SCOTT E.M.

101 – HUENNEKENS F.M. - Erythrocyte metabolim. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductases.
The J. of Biol. Chem. 227, 261, 1957.

102 – The role of the pentose phosphate path way in the reduction of methemoglobin in human erythrocytes. HUENNEKENS
Bioch. J. 84, 406, 1962.

103 – JAFFÉ E.R. - Hereditary methemoglobinemias associated with absormalities in the metabolism of erythrocytes.
American J. of Med 41, 786, 1966.

104 – SCOTT E.M. - The relation of diaphorase of human erythrocytes to inhéritance of methemoglobinemia.
J. of clin. invest. 39, 1176, 1960.

105 – MORRISON M. - A new hœmoprotein with a unique iron Porphyrin Prosthetic group isolated from human erythrocytes.
Nature 189, 765, 1961.

106 – SASS M.D. - Mechanism of the TPNH linked reduction of methemoglobin by methylene blue.
Clin. Chim. Acta 24, 77, 1969.

107 – SASS M.D. - TPNH methemoglobin reductase deficiency : a new red cell enzyme defect.
The J. of lab. and clin. Med. 70, 760, 1967.

108 – CARTIER P., LEROUX J.P. - Etude biochimique de deux cas de deficits congénitaux en pyruvate kinase.
Nouv. Rev. Fr. d'Hémat. 8, 854, 1968.

109, BOIVIN P. et GALAND C. - Recherche d'une anomalie moleculaire lors des deficits en pyruvate kinase erythrocytaire.
Nouv. Rev. Fr. d'Hemat. 8, 201, 1968.

110 – BOIVIN P., GALAND C. - Constante de Michaëlis Anormale pour le phosphoenol pyruvate au cours d'un deficit en pyruvate kinase erythrocytaire.
Rev. Fr. Etude clin. et Biol. XII, 372, 1967.

111 - MURPHY - Erythrocyte metabolim :cell shape and the location of cholesterol in the erythrocyte membrane.
J. of lab. and clin. med. 65, 1967.

112 – PONDER E. - Mesure de la mobilité électrophorectique des stromas de globules rouges humains. de l'hémoglobine et des formes myéliniques.
Rev. Franç. d'Hemat. 10, 531, 1955.

113 – LEGGE D.G. and SHORTMAN K. - The effect of pH on the volume, density and shape of erythrocytes and thymic lymphocytes.
Brit. J. Hœmat 14, 323, 1968.

114 – BONARD - SCHNEIDEGGER - Surfaces des hematies et proteines plasmatiques
Rev. Franç. d'étude clin. et Biol 3, 271, 1958.

115 – CHAPMAN, KAMAT, DEGIER, PENKET - Nuclear magnetic resonance spectroscopie - Studies of erythrocytes membranes.
Nature 507, 74, 1967.

116 – LANGLEY G.R., AXELL - Changes in erythrocyte membrane and autohemolysis during in vitro incubation.
Brit. J. Hœmat 14, 1968.

117 – KAMAT V.B., CHAPMAN D. - Nuclear resonance Studies of erythrocyte ghost at 220 M cycles/sec.
Biochim. Biophys. Acta 163, 411, 1968.

118 – ZAIB S.S. and JAUBERT S.M. - Starch gel Electrophoresis of erythocyte membranes in Hereditary spherocytosis
Brit. J. of Hœmotol. 14, 57, 1968.

119 – AZEN, ORR, SMITHIES - Starch gel electrophoresis of erythrocyte stroma.
The J. of lab. and clin. med. 65, 448, 1965.

120 – SCHRIER Stanley L. - ATP synthesis in human erythrocyte membranes.
Biochim. Biophys. Acta 135, 591, 1967.

121 – WINS P. and SCHOFFENIELS E. - The association of some oxydoreductases with the redcell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 185, 287, 1969.

122 – HARRIS J.R. - The isolation and purification of a macromolecular protein component from the human erythrocyte ghost.
Biochim. Biophys. Acta 188, 31, 1969.

123 – KLIBANSKY C., DE VRIES A. et KARCHALSKY A. - Pénétration de l'Albumine et de l'Hémoglobine dans les erythrocytes au cours de l'Hemolyse.
Path. Biol. Vol 8, nº 21-22-2005-2014, 1960.

124 - ROSENBERG Steven A. and Mc INTOSH J. Richard - Erythrocyte membranes effect of sonication.
Biochim. Biophys. Acta 163, 285, 1968.

125 – LEVINE M. and STEIN W.D. - Techniques for analysis of glucose binding by human erythrocytes membranes.
Bioch. Biophys. Acta 135, 710, 1967.

126 – DEUTICKE Bernhard - Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment.
Biochim. Biophys. Acta 163, 494, 1968.

127 – MINAKAMI S. and YOSHIKAWA H. - Studies on erythrocyte glycolysis - II Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis.
J. Biol. Chem. 59, 139, 1966.

128 – ROSE I.A., WARMS J.V B. and CONNEL E.L.O - Role of inorganic phosphate in stimulating the glucose utilization of human red blood cells
Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 33, 1964.

129 – TSUBOI, KK and FUKUNAGA D. - Inorganic phosphate and enhancedglucose degradation by the intact erythrocyte.
J. of Biol. Chem. 240, 2806, 1965.

130 – ROSE I.A. - Control of glycolysis in the human red blood cell
J. of Biol. Chem. 241, 4848. 1966

131 - KEITT A.S. and BENNETT - Pyruvate kinase deficiency and related desorders of red cell glycosis
Amer. J. Med. 41, 762 1966

132 – LOWY B.A., RAMOT B. - Adenosine triphosphate metabolism in the rabbit érythrocyte in vivo
Nature 181, 324, 1958.

133 – MANOHAR S.V. - The metabolism of the erythrocyte XVII. Mechanism of incorporation of adenine into and resultant elevation of ATP and ADP in human erythrocytes.
Can. J. Biochem. 45, 1153, 1967.

134 – TSUBOI K.K., ALLAN J.F. and FUKUNAGA K - Cofactors and erythrocytes glycolytic capacity.
J. Biol. chem. 241, 1616, 1966.

135 – RAMOT B., BROK F., BEN BASSAT I. - XIIe congress of international society of Hœmatology. Alteration in the metabolism of human erythrocyte with aging
Plenary Session papers - New-York 169, 1968.

136 – FUNKEL H.G. and BEARN A.G. - Minor Hemoglobin components of Normal blood.
Fred. Proc. 16, 760, 1957.

137 – DERN R.J., GWINN R.P. and WIORKOWSKI J.J. - Studies on the preservation of human blood
The J. of lab and clin medic. 67, 955, 1966.

138 – DERN R.J., BREWER G.J. and WIORKOWSKI J.J. - Studies on the preservation of human blood II The relation ship of erythrocyte adenosine triphosphate level and other in vitro measures to red cell storageability.
J. of lab' and clin. med 69, 968, 1967.

139 – SZEINBERG and MARKS - Substances stimulating glucose catabolisme by the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes.
J. of Clin. investig. 40, 914, 1961.

140 - HUENNEKENS F.M., CAFFREY - The electron transport sequence of methemoglobin reductase.
Ann. N.Y. Acad. Scien. 75, 167, 1958.

141 – CHANUTIN A. and CORNISH R.R. - Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.
Arch. Biochem. 121, 96, 1967.

142 – BREWER G.J. - Erythrocyte metabolism and fonction . Hexokinase inhibition by 2-3 diphosphoglycerate and inter action with ATP and Mg^{2+}
Bioch. Biophys. Acta 192, 157, 1969.

143 – GRIMES A.J. - The laboratory diagnosis of enzyme defects in the red cells
Brit. J. of Hœmat 17, 129, 1969

144 – RAPPORORT S and LUEBERING J. - Glycerate 2-3 diphosphatase
J. Biol. chem. 189, 683, 1951.

145 – KOLER R.D., BIGLEY R.N. - Pyruvate kinase : difference between human red cell and leucocyte enzyme. Cold spring harbor Symp. Quant
Biol. 29, 213, 1964

146 - BOIVIN P., GALAND C. - Mise en évidence d'un enzyme à cinétique anormale dans deux nouveaux cas de deficit en pyruvate kinase erythrocytaire.
Path. Biol. 17, 597, 1969.

147 – GIBSON Q.H. - The reduction of methœmoglobin in red cell and studies on the cause of idiophatic methœmoglobinemia.
Biochem. J 42, 13 1948

148 – SCOTT E.M. et Mc GRAW J.C. - Purification and properties of diphosphopyridine nucléotide diaphorase of human erythrocyte.
J. Biol. chem. 237, 249, 1962.

149 – Amino Acides - Peptides Protéines - Travaux 1964-1966 -
Proteine structure and fonctions - Perutz
E.S. A.E.C.

150 – RAPOPORT S. - Die enzymegulation auf dem niveau der laktat oxydoreduktase NADH und NADPH oxydosen sowie NADP reaktive laytat oxydoreduktase in roten Blutzellen:
Acta Biol. med. German. 13, 852, 1964.

151 – MORRISON D.B. and WILLIAMS E.F. - Metmemoglobin reduction by glutathione or cysteine.
Science 87, 15, 1938.

152 – OSKI F.A. - A simple micromethos for the detection of erythrocyte glucose 6 phosphate deshydrogenase deficiency.
The J. of Pediatrics 66, 90, 1965.

153 – KUMA Fumio - NADH methemoglobin reductase deficiency.
Japan. J. genetics 44, 271, 1969.
(XXII international congress of genetics)

154 – KAPLAN J.C. and BEUTLER E. - Electrophoresis of red cell NADH and NADPH diaphorase in normal subjects and patients with congenital methemoglobinemia.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 29, 605, 1967.

155 – BOULANGER P et POLONOWSKI J. - Traité de biochimie générale.
Ed. Masson 1964.

156 – ASKURA T., MINAKAMI S. - Effect of phosphate on the activity of NADH diaphorase from erythrocyte of Hereditary methemaglobinemia.
Clin. Chim. Acta 12, 120, 1965.

157 – KIESE M., SCHNEIDER C. - Hämiglobine reduktase
Naunyn - Schmiedeberg's Arch.
Exper. Path. 231, 158, 1957.

158 – TOWNES P.L. and LOWELL G.P. - Hereditary methemoglobinemia : a new variant exhibiting dominant inheritance of methemoglobin A.
Blood 18, 18, 1961.

159 – TOWNES P.L. and MORRISSON M. - investigation of the defect in a variant of methemoglobinemia.
Blood 19, 60, 1961.

160 – FAIRBANKS, FERNANDEZ - XIIe congress of international Society of Hœmatology, New-York 1968. Effect of Nile Blue and methylene blue on methemoglobin reduction and hemolysis in Köln hemoglobinopathie.
Abstracts 154.

161 – KNUTSEN C.A. and G.J.
Amer J. of clin. Path 45, 82, 1966.

162 – MILLS G.C. et RANDALL H.P. - Hemoglobin catabolism. II. the protection of hemoglobin from oxydative breakdown in the intact erythrocyte.
J. of Biol. chem. 232, 589, 1958.

163 – BEUTLER E., DURON O. et KELLY B.M. - Improved method for the determination of blood glutathion.
J. of lab. and clin. Med. 61, 882, 1963.

164 – BEUTLER E. - The glutathion instability of drug sensitive red cells.A new method for the in vitro detection of drug sensitivity.
J. of lab. and clin. Med. 49, 84, 1957.

165 – MOTULSKY A.G. et CAMPBELL-KRAUT - 1961 In : Blumberg B.S. ed. Proceedings of the conference on genetic polymorphism and geographic variations in disease N.Y. Grune and Stratton.

166 – FAIR BANKS, T.F. and BEUTLER E.
Blood 20, 591, 1962.

167 – BEUTLER E.
Blood 28, 553, 1966.

168 – BREWER G.J. and DERN R.J. - A new inherited enzymatic deficiency of human erythrocytes : 6 - phospho - gluconate - dehydrogenase deficiency.
Amer. J. of Hum.gen. 16, 472, 1964.

169 – PARR C.W. and FITCH L.I. - Hereditary partial deficiency of human erythrocyte 6 phospho gluconate dehydrogenase.
Biochem. J. 93, 286, 1964.

170 – HORECKER Bernard - Le cycle des pentoses et sa signification physiologique. Publications de la Société de chimie Biologique 1958.

171 – MORRISSON M. and STOTZ E. - The extraction on paper chromatography of Hemins. The J. of Biol. Chemistry 228, 123, 1957.

172 – MORRISSON M. - A new hemoprotéin with a unique iron prophyrin prosthetic group isolated from human erythrocytes. Nature 169, 765, 1961.

173 – MORRISON M., CONNELLY J., PETIX J.and STOTZ E. - Properties and structural consideration of Hemin The J. of Biol. chem. 235, 1202, 1960.

174 – BLUM K.U. - Regulation of carbohydrate metabolisme in the human erythrocyte (with special reference to the mode of Action of Iodoacetic Acid and methylene blue) Proc. 9th. Congr. Europ. Soc. Hœmat. Lisbon 756, 1963.

175 – SASS M.D. - Accummulation of methylene blue by metabolizing erythrocytes The J. of lab. and clin. med. 69, 447. 1967.

176 – DEVAUX Guy - Choix de techniques de Biochimie clinique Gauthier-Villars-Paris, 131.

177 – PRAETORIUS E. et POUSEN - Scand. J. Clin. lab. investig. 5, 273, 1953.

178 – HAUT A., TUDHORE G. - The non hemoglobin erythrocyte proteins studied by electrophoresis on starch gel. J. of clin. invest. 41 (3), 579, 1962.

179 – TSUTSUI E.A. et MARKS P.A. - A study of the mechanism by wich triphosphopyridine nucleotide affect human eytrhocyte G6 PD. Biochem. Biophys. Res. Comm. 8, 338, 1962.

180 – CHUNG A.E. et LANGDON R.G. - Human erythrocyte G6 PD. II Enzyme - co-enzyme interrelation ship. J. of Biol. chem. 238, 2317, 1963.

181 – KIRKMAN H.N. - Isoenzymes of human redcell: glucose 6 phosphate dephydrogenase.
Annals of the N.Y. Acad. of Sc. 151, 133, 1968.

182 – CABANNES R., LABIT D., ROSA J., RUFFIÉ J., BIERMÉ R. - Une "nouvelle" Hemoglobine par mutation portée sur la chaîne β, l'hémoblogine I Toulouse ($\alpha_2 \beta_2$ 66 lys → glu).
C.R. Acad. Sc. Paris 269, 111, 1969.

183 – SMITHIES O. - Molecular Size and starchgel Electrophoresis.
Arch. of Biochem. and Biophys Suppl. 1, 125, 131, 1962.

184 – PEARSON A. - Erythrocyte G6 PD activity related to thyroïd activity.
J. of lab. and clin. med 57, 343, 1961.

185 - BEUTLER Ernest - Pharmacological reviews.
Drug induced Hemolytic anemia
21, 73, 1969.

186 - BOIVIN - Progres dans les anémies hémolytiques congénitales.
La revue du Praticien 31 bis, 91, 1969.

187 – BEUTLER E., COLLINS Z. - Hybridizations of glucose 6 phosphate deshydragenase from rat and Human érythrocyte..
Sciences 150, 1306, 1965

188 – BEUTLER, COLLINS - Hybridization studies in the further characterization of erythrocyte glucose 6 phosphate deshydrogenase -
Experientia (Basel) 22, 827, 1966.

189 – YOSHIDA A. - In vitro hybridization of normal and variant human glucose 6 phosphate deshydrogenase .
Nature (Lond.) 216, 275, 1967.

190 – MAILES, AM et al.
Hum. Biol. 34, 206, 1962.

191 – VERGNES H. - La place de la G6PD en anthropologie Biologique.
Bull. et mem. de la Soc'. Anthrop. de Paris 7, 301, 1965.

192 – SALVIDIO E. and COLL - G6 PD deficiency in Italy.
Acta Mœmat 41, 331, 1969.

193 – FRAZER G.R.
J. Med. Genet 3, 35, 1966.

194 - STAMATOYANOPOULOS G., YOSHIDA A., MOTULSKY A.G. - Athens variant of G6 PD.
Science 157, 831, 1967.

195 – SHEBA C., SZEINBERG A. - Répartition de la deficience en G6 PD parmi les differentes communautés d'Israël. II conférence inter.génétique humaine, Rome 1961.

196 – RAGAB A.H. - Incidence of G6 PD deficiency in EGYPT.
American journal of Hum. genetic 18, 21' 1966.

197 – SAY B. et al.
Acta pœdiat (uppsala) 54, 319, 1965.

198 – TALEB N. et al.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 258, 5749, 1964.

199 – GELPI A.P.
Blood 25, 486, 1965.

200 – SANSONE G., PIGA ET SEGNI G. - Il favismo.
Torino. ES. Minerva medica 225, 1958.

201 – ORSINI A. et al. - Le favisme.
Sem. Hôp. 37, 557, 1961.

202 – MOLLISON P.L., DACIE J.V., RICHARDSON N., SELWYN J.C., SHAPIRA L. Atypical congenital hemolytic anemia. Quart J. Med. New series and the origin of sex chromatin. Proceding of the National academy of Sciences 48: 756, 1962.

203 – HADEN R.L. - New type of hémolytic jaundice without sphérocytosis.
Am. J. of Med. Sci. 214, 255, 1947.

204 – DREYFUS J.C., MALEKNIA N., KAPLAN J.C. - Recherche sur le déficit en G6 PD en France A propos de 200 dosages.
Nouv. Rev. Franç. d'Hémato. 4, 791, 1964.

205 – ALLISON A.C. - Erythrocyte G6 PD deficiency in West Africa.
Nature 190, 1198, 1961.

206 – DODIN A. - Problèmes d'hérédité. Cas particulier de l'anémie à hematies falciformes et du déficit en G6 PD chez les Malgaches.
Acad. Malgache 20 juill. 1967.

207 – DODIN A.
Arch. Inst. Pasteur Madagascar 33, 233, 1965.

208 – BAXY, A.J. et al.
Indian J. Med. Sci. 17, 493, 1963.

209 – SWARUP S. et al.
Indian J. Path. Bact. 4, 8, 61.

210 – BEUTLER E. et al.
Nature (Lond.) 183, 684, 1959.

211 – Mc CURDY, P.R. et al.
J. of lab. clin. Med. 67,374, 1966.

212 – WONG, P.W.K. et al.
Nature (Lond.) 208, 1323, 1965.

213 – SHINODA T. - In annual report, 1963 ; Tokio national institute of genetics 113.

214 – MOTULSKY A.G. et al. - In Blumberg, B.S. ed., Proceding of the conference on genetical and geographical variations in disease, New York 159, 180, 1961.

215 – FLATZ G. et al.
Acta genet. (Basel) 13, 316, 1963.

216 – FLATZ G. et al.
Ann. pœciat. (Basel) 203, 39, 1964.

217 – FLATZ G. et al.
Ann. hum. genet. 27, 315, 1964.

218 – HARRIS R.
Lancet 2, 1378, 1962.

219 – LUAN ENG, L.I. et al.
Ann. hum. Genet. 28,173, 1964.

220 – LUAN ENG, L.I. et al.
Nature (Lond.) 204, 291, 1964.

221 – LUAN ENG, L.I. et al.
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 58, 500, 1964.

222 – LUAN ENG, L.I.
Nature (Lond.) 204, 88, 1964.

223 – MOTULSKY A.G. et al.
J. med. genet. 1, 102, 1963.

224 – KIDSON C. - Erythrocyte G6 PD deficiency in New guinea and New Britain
17, 1120, 1961.

225 – BULTZ - OLSON, O.E. et al.
Nature (Lond.) 192, 765, 1961.

226 – KIDSON C.
Aust.. J. Sci. 25, 61, 1962.

227 – KIDSON C et al.
Amer. J. phys. anthrop. 20, 357, 1962.

228 – NIXON A.D. and BUCHANAN J.G. - Survey for erythrocyte G6 PD deficiency
in Polynesians.
The Amer. J. of Hum. genet. 21, 305, 1969.

229 – MARKS P.A. et al.
J. of clin. investig. 38, 2253, 1959.

230 – PORTER I.M. et al.
Lancet 1, 895, 1964.

231 – YOSHIDA A.
Science 157, 97, 1967.

232 – LISKER R. et al. - Studies on general genetic hematologic traits of Mexicans.
Blood 27, 824, 1966.

233 – SUTTON R.N.P.
Lancet 1, 855, 1963.

234 – SAR, VAN DER A. et al.
Enzymologia 27, 289, 1964.

235 – BEST W.R.
J. of lab. and clin. med. 54, 791, 1959.

236 – ACQUATELLA, de G. - Deficiencia de G6 PD en differentes grupos raciales de Venezuela, Caracas, University of Venezuela (Thèse)

237 – SMINK, D.A. et al.
Trop. geo. Med. 17, 236, 1965.

238 – NANCE W.E. - Cold Spr. Harb. Symp. Quant.
Biol. 29, 415, 1964.

239 – VERGNES H. et LARROUY G. - Les déficits en G6 PD dans des populations des Andes boliviennes.
Nouv. revue Franç. d'Hémato 1, 124, 1967.

240 – RUFFIÉ J., LARROUY G., VERGNES H. - Hématologie comparée des populations amérindiennes de Bolivie et phénomènes adaptatifs.
Nouv. revue Franç. d'Hémato 6, 544, 1966.

241 – STAMATOYANOPOULOS G. - The distribution of G6 PD deficiency in Greece.
American J. of Hum. Genetics 18, 296, 1966.

242 – ADAM A., SHEBA C., SZEINBERG A. - A comparative study of blood groups distribution among normal and G6 PD deficient subjetcs. Proc. XIe cong. Int. gen. 1963, 1, 277. La Haye, Excepta Medica, N.Y. Amsterdam.

243 – ALLISON A.C. - G6 PD deficiency in red blood cells of east african.
Nature 186, 531, 1960.

244 – ALLISON A.C. Malaria in african children with deficient erythrocyte G6 PD.
Brit. Med. J. 5236, 1346, 1961

245 – BALINSKY D., BERNSTEIN R.E. - The purification of G6 PD from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 67, 307, 1963.

246 – BALINSKY D. - Oxydation of reduced glutathione by acetylphenylhydrazine hemoglobin and erythrocyte.
Nature 199, 187, 1963.

247 – BERNSTEIN R.E. - Brillant cresyl blue screening test for demonstrating G6 DP deficiency in red cells
Clin. Chim. Acta 8, 158, 1963.

248 – BERNSTEIN R.E. - Occurence and clinical implications of red cells G6PD deficiency in South Africa Racial groups.
Sth afr. Med. J. 37, 447, 1963.

249 ZAIL S.S., CHARLTON R.W. - The hemolytic effect of certain drugs in Bantu subjects with a deficiency of G6 PD.
Sth. Afr. J. Med. Sci. 27, 95, 1962.

250 – BRULE M., PESTELM. - Intoxication par les fèves et hémoglobinurie
Presse Med 241, 1948.

251 – D'OBSENITZ A. "Anemie hemolytique aiguë après ingestion de fèvettes fraîches.
Arch. franç. Pediat. 10, 106, 1953.

252 - GIRAUD P., BERNARD R. - A propos de trois observations de favisme.
Arch. franç. Pédiat 16, 1397, 1959.

253 GIRAUD P., BERNARD R. - Les anémies sévères du petit enfant. Bilan statistique à propos de cent observations.
Pédiatrie 9, 433, 1954.

254 MAILLET R. - Fève, Calabre et hémolyse.
Revue Prat. XIV, 677, 1964.

255 – ORSINI A, COIGNET J - "Le favisme"
Ann. Pédiat. 37, 557, 1961.

256 BADETTI J. - Trois observations de favisme chez des enfants corses.
Arch. franç. de Pédiat. 12, 329, 1957.

257 – ORSINI A., RAYBAUD C.L. - Le favisme.
Med. Infant. 71, 97, 1964

258 – SZEINBERG A., SHEBA C. et ADAM A. - Sélective occurence of glutathione inactivity in red blood corpuscules of the various jewish tibes.
Blood 13, 1958, 1043.

259 - SZEINBERG et COLL - Differences in hemolytic susceptibility among subjects with G6 PD deficiency:
Clin. Res. 8, 18, 1960.

261 – SHEBA CH, SZEINBERG A. et COLL - Répartition de la deficience en G6 PD parmi les différentes communautés d'Israël".
IIe congr. int. gén. Hum. Rome in Exerpta Medica N.Y. Amster 1962.

262 - RAMOT B., ABRAHAMOV A., FRAZER Z. - The incidence and types of Thalassemia traits carriers in Israël.
Brit. J. of Hœmat 10.

263 – STAMATOYAMNOPOULOS G. et COLL - On the familial predisposition to favism.
Ann. J. of Hum. genetic 3, 253, 1966.

264 – VILMORIN - ANDRIEUX - Plantes potagères : Description et culture des principaux légumes des climats tempérés 1891.

265 – KANTOR S.E., HOCH D. - Immunologic studies on the pathogenesis of favism. Int. Arch. Allergy 29 nº 3, 264, 1966.

266 – GREENBERG M.S., WONG H. - Studies on the destruction of glutathione instable red blood cells.The influence of fava beans and primaquine upon such cells in vivo J. of labor. and clin. med. 57, 733, 1961.

267 – PANIZON F. VULLO C. - The mechanism of hemolysis in favism.
Acta Hœmat. 26 nº 6, 337, 1961.

268 – MAGER J., GLASER G., et COLL - Metabolic effect of pyrimidines derived from fava beans glycosides ou human erythrocytes deficient glucose 6 phosphate deshydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 235, 1965

269 –BONSIGNORE A., FORNAINI G. - Electrophoretic Hétérogeneity of erytrhocyte and leucocyte G6 PD in italians from various ethnic groups.
Nature 5051, 876, 1966.

270 – ALLISON A.C. et CLYDE D.P. - "Malaria and G6 PD".
Brit. Med. J. 5250, 521, 1961.

271 – LUZZATO Lucio - G6PD deficient red cells :resistance to infection by Malarial parasites.
Sciences 164, 3881, 1969.

272 - WILSON T. "Malaria and G6 PD"
Brit. Med. J. 1, 895, 1961.

273 – FROMENTIN M., DODIN A. - Culture de trypanosoma gambiense en milieu semi synthétique - Rôle de la G6 PD.
Presse med. 73, 499, 1965.

274 - SINISCALCO M. et COLL. - Population genetics of hœmoglobin variants, thalassœmia and G6 PD deficiency with special reference to malaria hypothesis.
Bull. Wld. Hlt. 34, 379, 1966.

275 PIGACHE J.P - Contribution à l'étude de l'hémo anthropologie des Malgaches
Thèse medecine NANCY 1969.

276 HAMMAMET - Colloque sur la génétique de l'homme mediterranéen.
Tunisie 1968. Alimentation et enzymopathie érythrocytaire dans le Bassin Méditérranéen. H VERGNES

277 – EATON J.W., BREWER G.J. - Role of red all 2-3 DPG in the adaptation of man to Altitude. The J. of lab. and clin. med. 73, 603, 1969.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIOCHIMIQUE DU GLOBULE ROUGE 1

- La voie des trioses 4
- La voie des pentoses et le métabolisme rédox 14
- Place du BM dans le métabolisme érythrocytaire 35
- Exploration du métabolisme rédox de l'érythrocyte 43
- Anomalies héréditaires des systèmes d'oxydo-réduction 49

DEUXIEME PARTIE : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 56

- Le globule rouge normal et le BM 58
- Particularités métaboliques de l'érythrocyte normal incubé avec du BM 96
- Étude de la perméabilité au bleu de méthylène au niveau des populations de sujets sains et malades 124

TROISIEME PARTIE : ÉTUDE ETHNO-BIOLOGIQUE 143

- La transmission héréditaire du déficit en G6PD 146
- Les variantes de la G6PD 156
- La répartition mondiale de la mutation 165
- Le favisme 184
- Déficience en G6PD et environnement 189

CONCLUSION GÉNÉRALE 191

Vu le Président de Thèse

J. RUFFIÉ

Vu et permis d'imprimer

TOULOUSE, le 26 Mai 1970

Le Doyen

Président du Conseil Transitoire de Gestion

G. LAZORTHES